



CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

Mestrado em Biotecnologia

Dissertação de Mestrado

**Seroprevalência e genotipagem de *Toxoplasma gondii* em roedores do
Parque Nacional do Limpopo**

Autora:
Vanessa Alexandra Comé

Maputo



CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

Mestrado em Biotecnologia

Dissertação de Mestrado

**Seroprevalência e genotipagem de *Toxoplasma gondii* em roedores do
Parque Nacional do Limpopo**

Autora:
Vanessa Alexandra Comé

Maputo
2025



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

Mestrado em Biotecnologia

Vanessa Alexandra Comé

**Seroprevalência e genotipagem de *Toxoplasma gondii* em roedores do
Parque Nacional do Limpopo**

Dissertação apresentada ao Centro de Biotecnologia da UEM como
parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Supervisor: Professor Doutor Luís Neves
Co-Supervisor: Doutor Fernando Mulandane

Maputo
2025

Seroprevalência e genotipagem de *Toxoplasma gondii* em roedores do Parque Nacional de Limpopo (PNL)

Estudante: Vanessa Alexandra Comé

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre de Biotecnologia.

Supervisores:

Professor Doutor Luís Neves: Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade de Pretória / Centro de Biotecnologia, UEM

Doutor Fernando Mulandane: Centro de Biotecnologia, UEM

Maputo, 25 de Agosto de 2025

DECLARAÇÃO

Declaro que esta dissertação nunca foi apresentada para a obtenção de qualquer grau académico ou em qualquer outro âmbito e que constitui o resultado do meu trabalho individual de campo, laboratorial e de pesquisa bibliográfica cujos autores são devidamente identificados no texto e na bibliografia final.

Esta dissertação é submetida em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane.

Maputo, 25 de Agosto de 2025

Assinatura

(Vanessa Alexandra Comé)

O SENHOR é meu pastor, nada me faltará.

Salmos 23:1

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de mais a Deus pelo dom da vida e bênção diária e, de seguida, à minha família, pelo apoio incondicional em todas as áreas da minha vida. Ao Filipe e à Ivete, meus pais, que são os meus pilares, aos meus irmãos Zizi e Jr., e aos meus filhos Eric e Erin que me impulsionam a correr atrás dos meus sonhos, aos meus tios, primos, sobrinhos que me dão força para conseguir superar todos os desafios.

Agradeço à minha turma do Centro de Biotecnologia (CB). Caminhamos de forma conjunta e sempre empenhados em crescer cientificamente. Aos meus colegas de mestrado de 2018, pessoas únicas, com as quais tive o imenso prazer de conhecer, conviver e aprender. Aos meus colegas do Departamento de Diagnóstico e Epidemiologia Molecular que me apoiaram de forma incondicional para concluir o mestrado e crescer profissionalmente no Centro. Um agradecimento especial, pelo companheirismo e aprendizado desde a iniciação científica vai aos colegas com os quais ingressei no CB, a Raquelina, Marília, Vladimiro e Valter. Reconhecimento vai também aos colegas dos outros Departamentos do CB pelo apoio em todas as vertentes do trabalho, e não posso esquecer de agradecer aos meus colegas do Projecto GALV-Med, onde fui recebida e apoiada com muito carinho.

Às minhas amigas, companheiras da vida, que sempre me motivaram a continuar com os estudos, pelas suas ideias simples que solucionam os problemas mais improváveis, o meu muito obrigada a todas elas sem excepção.

Aos meus supervisores, Professor Doutor Luís Neves e Doutor Fernando Mulandane, e ao Prof. Doutor José Fafetine pelo exemplo de pesquisadores e de pessoas que vou guardar por toda a vida.

Ao Projeto Italiano e FIAM por terem cedido o apoio financeiro ao projeto para a realização do trabalho de campo durante o meu mestrado. Em especial, agradeço às secretárias do CB, a Tuti e dona Vina, pela prontidão em ajudar e pelo excelente trabalho realizado no CB.

Lista de figuras

Figura 1: Lâmina microscópica com coloração de Giemsa (Taquizoides 5×10^6) de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> , ciclo sexuado	5
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> , ciclo assexuado	6
Figura 4: Incidência da Toxoplasmose mundial	8
Figura 5: Ciclo de transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i>	10
Figura 6: Distribuição geográfica das diferentes estirpes de <i>Toxoplasma gondii</i> no continente Africano	18
Figura 7: Localização do Parque Nacional do Limpopo e das aldeias onde foram feitas as colheitas	22
Figura 8: Laboratório do Centro de Biotecnologia	23
Figura 9: Armadilhas do tipo Sherman (A) e do tipo Mesh (B) montadas em machambas, em celeiros e em residências	25
Figura 10: Percentagem de amostras positivas pelo teste LAT	29
Figura 11: Percentagem de amostras positivas pelo teste LAT em relação ao sexo	30
Figura 12: Percentagem de amostras positivas pelo teste LAT em relação às espécies	30
Figura 13: Gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio visualizando produtos de PCR amplificados por marcador satélite, SAG1	32

Lista de tabelas

Tabela 1: Marcadores satélites de sequências SG1, SG2 e SG3

Tabela 2: Distribuição das espécies por localidade do PNL e presença de anticorpos

Tabela 3: Frequência de detecção dos 3 marcadores moleculares testados através do PCR-FRLP

Listas de abreviaturas

ATL - Tampão de lise

AW1/2 - Tampão de lavagem

CB-UEM - Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ETDA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HIV – Vírus de imunodeficiência humana

Km - Quilómetro

LAT - Teste de Aglutinação de Partículas de látex

Pb - Pares de base

PCR-RFLP - Reacção de polimerização em cadeia- Polimorfismo de comprimento de Fragmento de DNA gerados por Enzima de Restrição

PNL - Parque Nacional do Limpopo

RPM - Rotações por minuto

T. gondii- *Toxoplasma gondii*

TE - Tampão Tris etilenodiamino tetra-acético

SAG1/2/3 - Antígenos de superfície de *T. gondii*

Lista de símbolos

°C - graus Celsius

µg - micrograma

µl - microlitro

µM - micro molar

% - percentagem

Resumo

A toxoplasmose é uma infecção zoonótica causada por *Toxoplasma gondii* que resulta geralmente em abortos e uma variedade de infecções congénitas nos animais afectados. O objectivo do presente trabalho foi o de determinar a seroprevalência e detectar a presença de *Toxoplasma gondii* em tecidos de roedores amostrados no Parque Nacional do Limpopo (PNL). A captura dos roedores foi realizada entre Abril e Junho de 2019, em 4 das aldeias situadas dentro e fora do PNL. Cento e sessenta e um, soros provenientes de igual número de animais, foram testados para a presença de anticorpos, usando o teste de aglutinação de partículas de látex (PASTOREXTM TOXO – Bio-Rad France). Amostras de tecidos provenientes dos animais positivos foram posteriormente testados usando a reacção em cadeia de polimerase (*nested* PCR) para a detecção dos genes SAG1, SAG2 e SAG3. Das 161 amostras de soro testadas, 71 (44.1%) revelaram a presença de anticorpos contra *T. gondii* dos quais 48 fêmeas e 23 machos, correspondentes a 67.6% e 32.4%, respectivamente. Em relação às espécies de roedores seropositivas, 67.6% (48/71) pertenciam a *Mastomys natalensis*, 19.7% (14/71) a *Rattus rattus*, e 8.4% (6/71) a *Saccostomus campestris*. As espécies *Thallomys paedulus*, *Gerbilliscus leucogaster* e *Rattus norvegicus* apresentaram percentagens baixas de anticorpos com 1.4% (1/71) em cada espécie respectivamente. Órgãos (coração, diafragma, língua e cérebro) de 30 animais aleatoriamente escolhidos dos 71 roedores serologicamente positivos, foram posteriormente testados na *nested* PCR. A extracção de DNA das amostras foi realizada usando o kit QIAGEN e de seguida fez-se a amplificação por multiplex-*nested* PCR-RFLP. Uma amostra (1/30=3%) pertencente a espécie *Mastomys natalensis* dos roedores colhidos foi amplificada na região do gene SAG1.

Os resultados confirmam a ocorrência *T. gondii* em roedores das aldeias estudadas do PNL e arredores. Os isolados de *Toxoplasma gondii* que circulam no PNL são biologicamente e geneticamente idênticos àqueles que circulam em outros lugares do mundo, precisamente no Norte da América e da Europa. Esta similaridade pode estar relacionada com migrações de hospedeiros destes parasitas.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, roedores, Parque Nacional do Limpopo, LAT, *nested* PCR, genotipagem.

Abstract

Toxoplasmosis is a zoonotic infection caused by *Toxoplasma gondii* that commonly results in abortions and a variety of congenital diseases in the affected animals. The objective of the present work was to determine the seroprevalence and to detect the presence of *Toxoplasma gondii* in the tissues of rodents sampled in the Parque Nacional do Limpopo (PNL). The rodents were captured between April and June 2019, in 4 villages located inside and outside the PNL. One hundred and sixty-one sera from an equal number of animals were tested for the presence of antibodies using the latex particle agglutination test (PASTOREXTM TOXO – Bio-Rad France). Tissue samples from the positive animals were further tested using the polymerase chain reaction (nesterPCR) for the detection of the SAG1, SAG2 and SAG3 genes. Out of the 161 serum samples tested, 71 (44.1%) revealed the presence of antibodies, of which 48 females and 23 males, equivalent to 67.6% and 32.4%, respectively. Regarding seropositive rodent species, 67.6% (48/71) were *Mastomys natalensis*, 19.7% (14/71) *Rattus rattus*, and 8.4% (6/71) *Saccostomus campestris*. The species *Thallomys paedulcus*, *Gerbilliscus leucogaster* and *Rattus norvegicus* showed low percentages of antibodies with 1.4% (1/71) in each species, respectively. Organs (heart, diaphragm, tongue and brain) from 30 animals randomly selected from the 71 seropositive rodents were further tested using PCR-RFLP. DNA extraction from the samples was performed using the QIAGEN kit and then amplification by multiplex-nested PCR-RFLP. A sample (1/30= 3%) belonging to the species *Mastomys natalensis* from the collected rodents was amplified in the SAG1 gene region.

The results confirm the occurrence of *T. gondii* in rodents from the villages studied in the PNL and surroundings. The *Toxoplasma gondii* isolates that circulate in the PNL are biologically and genetically identical to those that circulate elsewhere in the world, more specifically in North America and Europe. This presence is believed to be associated with the migration of parasite hosts.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, rodents, Limpopo National Park, LAT, Mn-PCR, n-PCR, genotyping.

Índice

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Agente Etiológico	3
2.2	Ciclo de Vida	4
2.3	Transmissão.....	8
2.3.1	Transmissão em Humanos	8
2.3.2	Transmissão em animais	11
2.4	Sinais clínicos e sintomas da infecção por <i>T. gondii</i>	11
2.5	Diagnóstico da infecção por <i>T. gondii</i>	13
2.5.1	Diagnóstico directo.....	13
2.5.2	Diagnóstico indirecto	15
2.6	Genética	16
2.7	Prevenção.....	18
3	OBJECTIVOS	21
3.1	Objectivo geral.....	21
3.2	Objectivo específico	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Local do estudo.....	22
4.2	Captura dos roedores	23
4.3	Identificação dos roedores.....	25
4.4	Colheita de amostras para a detecção de DNA e anticorpos.....	26
4.5	Detecção de anticorpos por meio do LAT.....	26
4.6	Extração de DNA de amostras de cérebro, língua, coração e diafragma	26
4.7	Detecção molecular de <i>T. gondii</i>	27
4.8	Análise estatística	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Serologia	29
5.2	PCR	31
6	DISCUSSÃO	33
7	CONCLUSÃO.....	38
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
9	ANEXOS	39

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, vulgarmente conhecida por “doença do gato”, é uma infecção zoonótica causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, pertencente à Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidia e ao Filo Apicomplexa (Urquhart *et al.*, 1998). Este protozoário tem como hospedeiro definitivo o gato (família Felidae), daí a constante associação da doença aos felinos (Tenter *et al.*, 2009; Ajioka *et al.*, 2014), pois estes parecem ser a única família onde ocorre o estágio sexuado do parasita. Adicionalmente, os felinos são os únicos que expõem os oocistos resistentes no meio ambiente, desempenhando um importante papel na epidemiologia do parasita e constituindo motivo de elevada preocupação veterinária e de saúde pública (Aguirre *et al.*, 2019; Dubey, 2020).

A toxoplasmose é qualificada como um problema de saúde pública porque afecta significativamente a saúde humana, dos animais domésticos, e selvagens, e ainda os oocistos têm o grande potencial de contaminar o ambiente (Aguirre *et al.*, 2019; Plooy *et al.*, 2023).

A toxoplasmose é uma doença cosmopolita encontrada em todos os habitats e regiões, do Ártico aos trópicos, em áreas terrestres, aquáticas e ambientes marinhos (Aguirre *et al.*, 2019). A doença afecta vertebrados domésticos e selvagens, incluindo o Homem, que fazem parte do ciclo de vida do parasita como hospedeiros intermediários (Galal *et al.*, 2018; Halonen e Weiss, 2013). Nos humanos, esta doença causa entre outros, anomalia congénita, abortos e cegueira infantil (Montoya e Liesenfeld, 2004). Nos hospedeiros intermediários a infecção por *T. gondii* pode causar aborto, ou sintomas neurológicos (Montoya, Liesenfeld 2004), falha reprodutiva em animais, principalmente ovinos, caprinos e suínos (Tagwireyi *et al.*, 2019), enquanto nos roedores normalmente é assintomática, embora casos de infecção clínica possam por vezes ser reportados (Hill, 2005).

A transmissão da doença em humanos ocorre por três vias principais: i) ingestão de oócistos, eliminados nas fezes dos felinos, que se tornam infectantes no ambiente; ii) consumo de carne crua ou mal cozida de hospedeiros intermediários, particularmente de animais domésticos, contendo cistos teciduais viáveis (Urquhart, 1998); e iii) via congénita, durante a gestação (Chiebao, 2016; Hill, 2005).

Dentre os hospedeiros intermediários de *T. gondii* destacam-se os roedores por, entre diversas razões, serem conhecidos como hospedeiros amplificadores de diversas doenças

(incluindo a toxoplasmose) e por constituírem presas importantes para felinos selvagens e domésticos (Rabiee, 2018). Em termos de características biológicas e morfológicas, possuem um curto período de maturação e alta capacidade de adaptação para sobreviver em ambientes arbóreos, aquáticos e terrestres (Meerburg e Kijlstra, 2009). Os roedores infectam-se ao ingerir oócitos esporulados presentes na água, comida, no solo, ou vegetação (Dabritz *et al.*, 2008) e desempenham um papel central na manutenção e circulação do *T. gondii* nos diversos habitats, jogando um importante papel na disseminação e transferência do *T. gondii* para os outros mamíferos, incluindo o Homem (Gennari *et al.*, 2015) e são presas comuns para os felinos (Hall *et al.*, 2000).

Inúmeros testes serológicos como Imunofluorescência indireta, Hemaglutinação indireta, Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), têm sido propostos para detectar a presença de anticorpos contra *T. gondii*, destacando-se o Teste de Aglutinação de Partículas de Látex (LAT). O LAT é um teste de aglutinação indirecta, de baixo custo e simples manuseamento, onde as partículas de látex são revestidas por uma ligação covalente com antígenos solúveis da membrana e do citoplasma de *T. gondii* (Gomes, 2013). Para além dos testes serológicos, a detecção da infecção por *T. gondii* pode ser efectuada com recurso a reacção de polimerização em cadeia (PCR) por ser uma técnica rápida, com alta especificidade e sensibilidade e sem reacção cruzada com outros parasitas (Burg *et al.*, 1989; Kasper *et al.*, 2009).

Em Moçambique, estudos relacionados com a toxoplasmose animal são escassos, contudo, os hábitos alimentares, as práticas agropecuárias, o nível socioeconómico da população particularmente a suburbana e as características climáticas do país, sugerem que a ocorrência e a disseminação da doença, sejam frequentes. Na província de Gaza, especificamente no distrito de Massingir, há uma elevada produção agrícola que atrai um elevado número de roedores (ratos) e um grande número de animais domésticos como o gato, todos estes com fraca assistência veterinária. Por estas razões, estudos relacionados com a avaliação da infecção por *T. gondii* nos roedores, bem como com as estirpes neles circulantes, revestem-se de grande importância biológica, ecológica e de saúde pública, daí a pertinência do presente estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agente Etiológico

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), um protozoário coccídio intracelular obrigatório, pertencente ao Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea e Ordem Coccidia (Urquhart *et al.*, 1998, Weiss, 2009). A primeira descrição e a nomenclatura de *T. gondii* data de 1908, quando este foi isolado no Norte de África de um roedor africano, o gundi, da espécie *Ctenodactylus gundi* (Innes, 2010).

Os primeiros casos da doença foram assinalados em 1923 por Junku, quando observou um quisto parasitário na retina de uma criança com hidrocefalia e microftalmia (Tenter *et al.*, 2000; Rey, 2001).

O género foi nomeado por Charles Nicolle e Louis Manceaux como *Toxoplasma* que significa “forma de arco” (do grego: toxo = arco e plasma = criatura), termo que provém do formato do protozoário, que se apresenta alongado e encurvado em arco ou crescente e com uma extremidade mais atenuada como se observa na Figura 1 (Weiss, 2009).

O *T. gondii* mede 4-8 µm de comprimento e 2-4 µm de largura. Durante o seu ciclo de vida apresenta três formas evolutivas e infecciosas: oocistos, taquizoítos e bradizoítos com formas e estruturas variadas (Montoya e Liesenfeld, 2004).

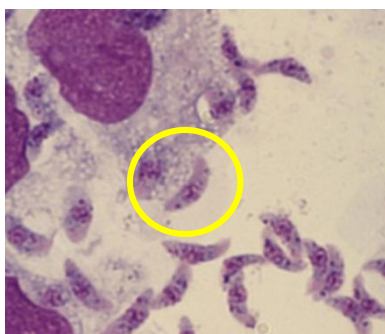


Figura 1: *Toxoplasma gondii*. Lâmina microscópica em coloração de Giemsa (Taquizoides 5×10^6) de *Toxoplasma gondii* retirado do líquido peritoneal do morganho. Em evidência o círculo amarelo é o taquizoide Fonte: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/Toxoplasmosis_il.asp?body=S-Z/Toxoplasmosis/body_Toxoplasmosis_il1.htm

Em 1948, foi criado o primeiro teste serológico para a detecção de anticorpos contra o *T. gondii*, por Sabin e Feldman, para o uso em humanos e outros animais. Com a descoberta desta técnica, foi possível estudar a prevalência da infecção, bem como iniciar a pesquisa de possíveis rotas de transmissão deste parasita (Innes, 2010).

2.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* é incomum, visto que o organismo é capaz de se replicar de forma indefinida usando dois ciclos, sexual ou assexual, que ocorrem tanto nos hospedeiros definitivos – os membros da família Felidae (Gatos) – quanto nos hospedeiros intermediários – mamíferos, incluindo o homem, e aves – (Boothroyd, 2002). O ciclo sexuado (Figura 2) inicia-se nos felinos (Ajioka *et al.*, 2014) e ocorre dentro das células epiteliais dos intestinos, culminando com a produção de oocistos que são expelidos para o ambiente através das fezes. Os oocistos são altamente infecciosos e extremamente estáveis no ambiente (solo, pastagens e águas) (Boothroyd, 2002).

Segundo Ajioka *et al.* (2014), após a ingestão de cistos teciduais pelos felinos, os parasitas invadem os enterócitos, passando por várias fases de divisão até sua diferenciação em microgametócitos e macrogametócitos. Os gametócitos se fundem para formar um zigoto, o qual se transforma em oocisto que é encontrado no ambiente nas fezes do gato. O oocisto sofre meiose, produzindo um octeto de esporozoítos que é altamente infeccioso, resistente a danos ambientais e pode persistir por anos num ambiente húmido. Após a ingestão por um hospedeiro intermediário (por exemplo um roedor) os esporozoítos diferenciam-se na forma de taquizoítos numa rápida divisão, que estabelece e sustenta a infecção aguda. Durante a infecção aguda, pode ocorrer a transmissão congénita para o feto em desenvolvimento. Os oocistos e bradizoítos, ao serem libertados no tubo digestivo sofrem intensas multiplicações intracelulares, onde formas de multiplicação rápida, os taquizoítos, invadem vários tipos de células dos hospedeiros onde formam vacúolos e se multiplicam rapidamente formando novos taquizoítos (Tenter *et al.*, 2000).

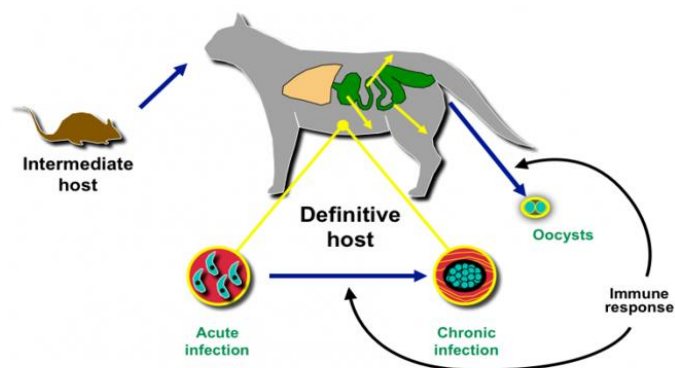


Figura 2: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. O ciclo sexual ocorre exclusivamente no estágio enteroepitelial no intestino delgado dos felinos, após a ingestão de um hospedeiro intermediário, e passa por vários ciclos de divisão e diferencia-se em micro e macrogametocitos que se fundem e formam o oocisto. Fonte: <https://icatcare.org/advice/toxoplasmosis-and-cats/>

O ciclo assexuado (Figura 3) ocorre quando um hospedeiro intermediário, tal como um roedor ou qualquer outro animal homeotérmico, ingere o oocisto esporulado presente no ambiente, ou através da ingestão de carne crua ou mal passada, ou ainda através da via transplacentária. Em muitos hospedeiros ocorre uma fase crônica da doença, à medida que o taquizoito se transforma em uma forma de divisão lenta conhecida como bradizoito que se dissemina pelo hospedeiro por intermédio dos sistemas circulatório e linfático e possui afinidade por músculos estriados, coração, cérebro e pulmão, tendo maior taxa pelo sistema nervoso em roedores (Dubey, 1997). Os cistos latentes (bradizoitos) persistem por toda a vida nos hospedeiros, ressurgindo ocasionalmente, contudo não produzem doença em indivíduos saudáveis (Kim e Weiss, 2008).

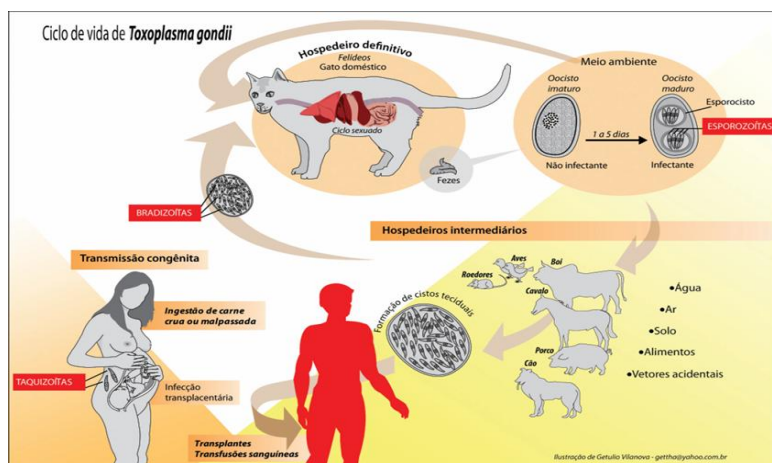


Figura 3: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. O ciclo assexuado ocorre nos hospedeiros intermédios são infectados pela ingestão de material vegetal, solo ou água com oocistos contaminados que se transformam em taquizóides. Os taquizóides quando se localizam nos tecidos musculares e neurais sofrem divisão e evoluem e se transformam em bradizóides, que se tornam numa fonte de infecção. Fonte: Moura et al. (2009).

2.3 Epidemiologia

A toxoplasmose foi descrita em várias espécies animais. Para Gangneux e Dardé (2012), a grande maioria se encontra em ambiente selvagem, chegando a 100% nos felídeos selvagens. Esta distribuição é devido à contaminação do meio ambiente pelos oocistos dos hospedeiros definitivos, podendo também ser encontrados em ambientes rurais pela circulação de gatos vadios. A expansão da infecção depende de vários factores como as características físicas, biológicas e ecológicas. A sobrevivência dos oocistos está relacionada ao clima, onde as zonas com clima seco e quente apresentam uma prevalência baixa enquanto que, em climas tropicais e húmidos a prevalência é relativamente alta (Jones e Dubey 2014). O comportamento alimentar dos animais influencia a prevalência da toxoplasmose, tendo os herbívoros uma menor taxa em relação aos carnívoros e omnívoros, dada a eficácia do ciclo predador-presa (Smith e Frenkel, 1995).

Nos humanos, a toxoplasmose é uma doença cosmopolita com prevalências que variam de 10% a 80% (Tenter *et al.*, 2000). A sua distribuição é influenciada por diversos factores tais como sócio-económicos; contacto com animais domésticos e de produção; hábitos alimentares dos potenciais hospedeiros; espécies animais e densidade populacional; factores geográficos e climáticos; e níveis educacionais (Rey, 2001). A França, por exemplo, apresenta uma prevalência serológica de *T. gondii* relativamente alta (Figura 4), pelo hábito de consumir carne mal cozida (Jones e Dubey 2014). Nos EUA, onde mais de um milhão de pessoas são infectadas a cada ano por *T. gondii* e aproximadamente 2.839 pessoas desenvolvem doenças oculares sintomáticas, o custo anual da doença foi estimado em quase US \$ 3 bilhões e uma perda anual de 11.000 anos de vida ajustada pela qualidade (Aguirre *et al.*, 2019).

A seroprevalência de *T. gondii* aumenta com a idade, não apresenta diferença entre sexos, e é menor em países de clima frio e árido ou em altitude elevada. A incidência de infecção varia com o grupo populacional, localização geográfica, temperaturas e humidade elevadas favorecem a persistência de oocistos no ambiente (Montoya e Liesenfold, 2004). Existem vários estudos sobre a seroprevalência em todo o mundo, mas estudos com foco em países africanos são limitados. Alguns estudos feitos em Moçambique por vários autores relatam a existência da doença em indivíduos imunocomprometidos com

encefalite e em mulheres grávidas (Domingos *et al.*, 2013; Manuel *et al.*, 2020). Estes estudos indicam que a prevalência de *T. gondii* varia de 4% a 93% na população em geral (Domingos *et al.*, 2013; Paul *et al.*, 2018). O estudo feito por Siteo *et al.*, (2010) em mulheres grávidas, HIV-positivas, revelou 18,7% de seroprevalência em *T. gondii*.

Infecções assintomáticas por *T. gondii* são amplamente prevalentes em pequenos mamíferos, incluindo roedores. A toxoplasmose que ocorre em roedores e seres humanos é similar quanto ao desenvolvimento de sinais clínicos (Dubey e Frenkel, 1998; Dabritz *et al.*, 2008).

A seroprevalência de *T. gondii* em roedores urbanos da Grande São Paulo, mostrou uma baixa positividade de 0,46%. O isolado obtido foi caracterizado como genótipo recombinante I, III e u-1 por PCR-RFLP, sugerindo que estes animais não possuem um papel importante na cadeia epidemiológica mesmo sendo hospedeiros intermédios deste patógeno (Muradian, 2012).

DeFeo *et al.* (2002), obtiveram soro de pequenos roedores selvagens em Rhode Island (EUA), analisaram através do teste de aglutinação modificado e obtiveram uma seroprevalência baixa de 0,8% (6/756). Esta baixa taxa entre os roedores foi atribuída à propriedade biológica do *T. gondii* em algumas espécies de roedores, que podem ser negativos aos testes de diagnóstico usados comumente mesmo estando infectados.

Num estudo numa aldeia no Senegal onde foram capturados 1025 roedores, foi reportada uma seroprevalência de cerca de 4% (Brouat *et al.*, 2018).

A prevalência da toxoplasmose varia de acordo com a espécie afectada, estudos feitos relatam que animais domésticos/ animais de consumo são os mais infectados como os ovinos, caprinos, suínos e bovinos (Dubey e Thulliez, 1993), um estudo na África do Sul reportou uma seroprevalência de 83,3% de toxoplasmose em todas as explorações estudadas de animais domésticos de interesse económico como ovinos, caprinos, suínos e frangos, (Tagwireyi *et al.*, 2019).

Incidência mundial

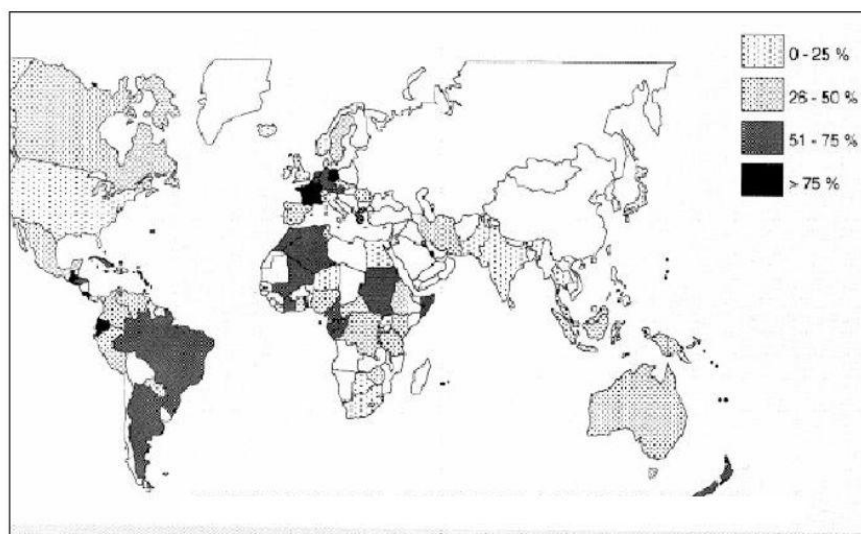


Figura 4: Incidência da Toxoplasmose mundial. A incidência varia muito de local para local, onde varia de valores abaixo de 25% nas zonas de América do Norte e África do Sul para valores superiores a 75% nas regiões da América do Sul, parte da Europa e África Ocidental. Fonte: <https://slidesplayer.com.br/slide/8685287/>

2.3 Transmissão

Com a descoberta do ciclo de vida do *T. gondii* foi possível descobrir a transmissão e as fontes de infecção que são extremamente diversificadas. O parasita tem sido encontrado em grande número de espécies domésticas, selvagens, e também afecta o Homem (Rey, 2001; Dubey, 2007).

Segundo Cunha (2014), todas as formas evolutivas de *T. gondii* são infectantes tanto para os hospedeiros definitivos quanto para os intermediários.

2.3.1 Transmissão em Humanos

Em humanos, a infecção por *T. gondii* é comumente adquirida (Figura 5) através da transmissão alimentar ou ingestão de carne mal cozida ou marisco, contendo cistos teciduais - bradizoítos, ou pelo consumo de leite não pasteurizado contendo taquizoítos. O consumo das carnes principalmente ovinas, caprinas e suínas tem sido indicado como o principal factor de risco para a aquisição da toxoplasmose (Tagwireyi *et al.*, 2019), no

entanto, também pode ser adquirido pela ingestão de oócistos esporulados, presentes na água, fruta ou vegetais (Gangneux e Dardé, 2012).

O gato excreta milhões de oocistos num curto período de tempo (aproximadamente duas semanas), contaminando os mais variados substratos, nos ambientes domésticos e peri-domésticos. As pessoas podem ser infectadas acidentalmente por oocistos, ao ingerirem qualquer coisa que tenha entrado em contacto com as fezes de um gato contendo oocistos de toxoplasma (Breganó *et al.*, 2010).

A toxoplasmose congénita pode ser diagnosticada como doença neonatal, onde as mulheres que contraem toxoplasmose durante a gestação transmitem a infecção aos filhos por via transplacentária. Taquizoitos de *T. gondii* cruzam as barreiras histológicas materno-fetais, infectando os tecidos do feto, onde as manifestações clínicas dependem do período de infecção adquirida no útero (Mondaca, 2012), embora Rey (2001), defenda que mulheres com infecção crónica não contaminam os seus filhos, durante o desenvolvimento intra-uterino.

A transmissão da infecção nas primeiras semanas de gestação resulta na maior gravidade da doença, com um quadro agudo e subagudo da doença, enquanto que a transmissão no final da gestação resulta em doença subclínica ou assintomática que se manifesta mais tarde na vida da criança (Remington *et al.*, 2006). As crianças não tratadas chegam a desenvolver cerca de 85% dos sintomas da doença, incluindo coriorretinite, calcificação cerebral, perturbações neurológicas e atrasos no desenvolvimento (Remington *et al.*, 2006). Entretanto, mais de metade dos filhos de mães que se infectaram durante a gravidez nasceram sem sinais da toxoplasmose, mas com o andar do tempo os sinais surgirão (Dubey e Jones, 2008).

As manifestações clínicas da toxoplasmose congénita podem ser de vária ordem, contudo incluem coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardo psicomotor ou mental, anemia, icterícia, erupção cutânea, petéquias, encefalite, microcefalia, calcificação intracraniana e hidrocefalia (Weiss, 2009; Mondaca, 2012).

Os sinais típicos de toxoplasmose congénita foram descritos pela primeira vez por três patologistas nomeadamente Wolf, Cowen, e Paige em Nova York, EUA, pela identificação de toxoplasmose numa recém-nascida que teve convulsões e apresentava lesões como hidrocefalia, calcificação intracerebral e coriorretinite. Estes são os sinais típicos da toxoplasmose congénita (Wolf *et al.*, 1939).

Wolf *et al.* (1939), relataram a toxoplasmose num menino de 6 anos de idade que se queixava de fortes dores de cabeça, mas sem sinais clínicos óbvios de toxoplasmose. O

menino desenvolveu sinais neurológicos e morreu no 30º dia da doença. O cérebro e a medula espinal foram removidos para exame histopatológico e bioensaio. Para a confirmação do *T. gondii*, os quistos existentes no cérebro, foram inoculados e isolados em murganhos e este isolado recebeu as iniciais da criança e se tornou a famosa estirpe RH. Embora a infecção assintomática por *T. gondii* tenha resultado em uma infecção latente com cistos teciduais, comum em humanos, a infecção sintomática, isto é, toxoplasmose, é vista com muito menos frequência. Grupos específicos de pacientes, incluindo fetos e recém-nascidos infectados congenitamente e indivíduos imunologicamente comprometidos, apresentam alto risco de infecção grave por este parasita.

Shulman (1991) defende também a existência de raros casos de transmissão por transfusão de sangue e transplante de órgãos. No caso de transplantes, os receptores de órgãos podem ficar infectados recebendo um órgão de um dador toxoplasma positivo. Embora seja raro, as pessoas podem também ser infectadas por receber sangue infectado através da transfusão. Os trabalhadores de laboratório que manuseiam sangue infectado estão igualmente em risco de contraírem a infecção através de inoculação acidental.

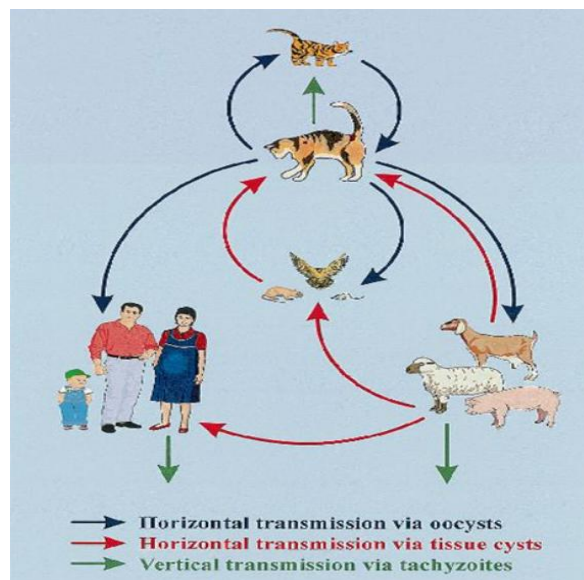


Figura 5: Legenda: Ciclo de transmissão do *Toxoplasma gondii*. (→) representa a toxoplasmose congênita; (→) representam a toxoplasmose adquirida. Fonte: TOXOPLASMOSE *Toxoplasma gondii* Parasitologia – Farmácia ppt carregar-

2.3.2 Transmissão em animais

Nos animais as fontes de infecção são a feco-oral e congénita. Os gatos são fundamentais na epidemiologia do *T. gondii* porque são os únicos hospedeiros que podem excretar oocistos ambientalmente resistentes (Koloren e Dubey, 2020).

Como os humanos, os roedores são hospedeiros intermediários para o *T. gondii*. Assim como os outros animais de sangue quente, os roedores são infectados principalmente pela ingestão de oocistos do solo, na pastagem ou água contaminada que constitui um dos meios de contaminação natural (Tenter, 2000; Dabritz *et al.*, 2008). Em geral os animais, incluindo os roedores, têm um curso de infecção por *T. gondii* assintomática, mas por vezes pode ocorrer a toxoplasmose clínica que é relativamente rara (Hill, 2005) enquanto que nos felinos a toxoplasmose clínica é mais frequente (Dubey e Jones, 2008).

Para os animais domésticos, a principal via de infecção são os alimentos e água contaminados pelas fezes de felinos, particularmente dos gatos, que são a principal fonte de infecção para todos os animais e para os humanos. Os gatos e cães se infectam caçando pequenos animais contaminados (Rey, 2001; Stelzer *et al.*, 2019).

Casos de toxoplasmose congénita foram igualmente relatados por Dubey e Jones (2008) em porcos. Nos pequenos ruminantes, a toxoplasmose congénita tem como principal característica os distúrbios reprodutivos, que gera grandes perdas económicas. Estes animais são considerados as espécies mais susceptíveis (Garcia *et al.*, 1999). Nas ovelhas foi descrito por Dubey, *et al.*, 2010 que cerca de 2% destas são infectadas pela via congénita e que ovelhas infectadas naturalmente transmitiam a infecção por via transplacentária (Dubey e Beattie, 1988).

A infecção congénita em humanos, ovinos, suínos e caprinos ocorre principalmente no momento da gravidez, e pode atingir o feto através da placenta, causando danos graves, como a malformação congénita, doença ocular, hidrocefalia, aborto reabsorção e morte neonatal (Innes *et al.*, 2009; Stelzer *et al.*, 2019), caso contrário nos roedores a infecção congénita pode ocorrer repetidamente durante a vida do animal (Dubey, 2010).

2.4 Sinais clínicos e sintomas da infecção por *T. gondii*

Os sintomas mais graves nos humanos aparecem durante a infecção congénita e incluem surdez, danos na retina, atraso mental, hidrocefalia, entre outros (Montoya e Liensensfeld, 2004). A infecção pós-natal é quase sempre assintomática, podendo ocorrer

linfadenopatia, febre baixa, fadiga, dores musculares, dores de cabeça, miocardite, coriorretinite e outros sintomas inespecíficos (Tenter, 2000; Weiss, 2009). Em alguns casos, pode ocorrer toxoplasmose ocular, que pode ser acompanhada por perda parcial ou total da visão (Dubey, 2007; WHO, 2014). Embora *T. gondii* esteja ligado a diversas doenças mentais e transtornos psiquiátricos, com repercussões económicas consideráveis, pois podem afectar as capacidades de trabalho do indivíduo bem como a vida social, principalmente aquelas relacionadas a tentativas de suicídio, como depressão e esquizofrenia.

A infecção congénita ou infecção aguda adquirida resulta numa doença recorrente em crianças infectadas. A coriorretinite, linfadenite, erupção cutânea, febre, dores de cabeça, mialgia, hepatite são manifestações característica e comuns da doença (Dubey, Beattie 1988).

Em pacientes com HIV, as manifestações clínicas incluem diminuição do nível de consciência, dificuldades motoras, paralisia dos nervos cranianos, anomalias sensoriais, sinais cerebrais e alterações comportamentais que podem ser confundidos com sintomas psiquiátricos. A encefalite é a maior causa de morbidade nestes pacientes (Montoya e Liensenfeld, 2004).

Nos gatos os sinais podem incluir febre, inflamação ocular, anorexia, letargia, miocardite, uveíte, dermatite, desconforto abdominal, e distúrbios do sistema nervoso. A pneumonia é a manifestação clínica mais importante da toxoplasmose em gatos (Vollaire *et al.*, 2005). E ainda apresenta outras manifestações como hepatite, necrose pancreática, miosite e encefalite. Referir que a toxoplasmose clínica apresenta um curso maioritariamente grave em gatinhos infectados na forma congénita (Dubey e Lappin, 2006).

Num estudo feito por Dubey *et al.*, (2009) foram descritas algumas manifestações clínicas em cães como a pneumonia, hepatite e encefalite acompanhados de sinais neurológicos como ataxia, convulsões, alteração de comportamento, paralisia, paraplegia e tremores. Abortos em cadelas e morte foram igualmente documentados.

Em animais de produção a toxoplasmose causa falhas reprodutivas, abortos, anomalias fetais e mortalidade neonatal levando a perdas na pecuária, associadas a grandes problemas económicos (Dubey *et al.*, 2012). Menos comum, mas igualmente reportados são breves episódios de febre, falta de apetite que podem levar alguns dias (Stelzer *et al.*, 2019). Os animais de produção, têm um papel importante na transmissão da infecção por

T. gondii, que tem implicações na saúde pública, visto a infecção do humanos estar associada ao consumo de carne mal cozida, ou carne crua destas espécies (Ji *et al.*, 2023).

2.5 Diagnóstico da infecção por *T. gondii*

O diagnóstico de *T. gondii* tanto em animais como em humanos pode ser estabelecido directamente pela detecção do DNA usando os testes moleculares, Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), exames histopatológicos e isolamento do parasita, ou bioensaio ou ainda indirectamente por meio de testes serológicos, através da detecção de anticorpos. É de grande importância relizar o diagnóstico pois os sinais clínicos da toxoplasmose confundem-se com outras doenças, dificultando o seu diagnóstico, as medidas de tratamento e a difusão desta enfermidade.

2.5.1 Diagnóstico directo

O diagnóstico directo da toxoplasmose baseia-se na identificação de *T. gondii* por cultura celular ou isolamento através do bioensaio. São considerados padrão de ouro para a definição da infecção, embora sejam métodos demorados, laboriosos, de custo elevado além de serem poucos sensíveis (Castro *et al.*, 2001; Kompalic-Cristo *et al.*, 2007; Ghani, 2011).

Os exames histopatológicos permitem observar a presença das formas evolutivas de *T. gondii* em vários tecidos através da coloração, por meio de corantes específicos. taquizoítos que estão presentes durante a infecção aguda, são visíveis na coloração de Giemsa ou de Wright (Souza e Belfort, 2014).

Dentre os métodos directos, os testes moleculares são os mais usados, destacando-se a técnica de PCR (Kompalic-Cristo *et al.*, 2007) que é rápida, simples, apresentando alta especificidade e sensibilidade, especialmente quando se utiliza a nested PCR (Burg *et al.*, 1989; Su *et al.*, 2010). A técnica PCR revolucionou o diagnóstico e a pesquisa de *T. gondii*, uma vez que para além da elevada sensibilidade e especificidade, é muito útil para identificar/detectar o parasita na fase aguda da infecção, podendo ser realizada com qualquer tipo de material biológico, requerendo ínfimas quantidades de amostra (Burg *et al.*, 1989). Contudo, esta técnica possui desvantagens como os elevados custos e pelo facto de ser uma técnica muito complexa e demorada (Sevivas, 2011). Adicionalmente, esta técnica não discrimina se o material é de um parasita vivo ou um fragmento residual de DNA (Montoya, 2002). Esta técnica ganhou popularidade nas últimas duas décadas

pelo facto de incluir não apenas a detecção molecular do parasita, mas também sua caracterização. Alternativamente, a caracterização molecular de linhagens de *T. gondii* com o desenvolvimento de métodos baseados no uso de marcadores moleculares, pode fornecer informações sobre a distribuição geográfica de diferentes linhagens e genótipos (Su *et al.*, 2010). Inicialmente, o alvo comumente utilizado era o gene P30 de cópia única, que codifica o principal antígeno de superfície do *T. gondii* (SAG1) (Burg *et al.*, 1988; Ghani, 2011). Em busca de uma melhor sensibilidade, outras sequências-alvo foram utilizadas. De acordo com a literatura, um dos genes mais utilizados é o B1 (2,2Kb) que se encontra repetido em 35 cópias no genoma do *T. gondii*. Esse gene B1 foi descrito por Boothroyd *et al.* em 1987 e demonstrou alta sensibilidade, provavelmente porque o gene B1 é uma sequência de DNA repetida com número de cópias superior ao P30 (Yan *et al.*, 2004) e é capaz de detectar até 1 parasita em cerca de 100 mil células hospedeiras (Burg *et al.*, 1989). No entanto, existem desvantagens devido ao custo elevado; pequeno número de laboratórios aptos à realização dos testes e falta de padronização das amplificações (Pelloux *et al.*, 1998).

Para Souza (2009), qualquer método de identificação molecular deve permitir a diferenciação correcta de espécies e subtipos e, principalmente, deve apresentar elevada reprodutibilidade. Assim, a escolha do método a ser aplicado deve ser feita de acordo com a finalidade pretendida (identificação ou diferenciação).

Um dos métodos de genotipagem mais utilizados é a Análise de Restrição de Fragmentos Polimorfos (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP). Este método é baseado na clivagem enzimática do DNA com endonucleases de restrição. As enzimas ou endonucleases de restrição são classificadas de acordo com a estrutura, actividade e sítios de reconhecimento e clivagem de DNA. O sítio de reconhecimento é normalmente uma sequência palindrômica, isto é, possui um eixo de simetria onde a sequência de bases da fita 'sense' do DNA é a complementar na fita 'anti-sense'. Sendo assim, o método consiste em clivar o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de pesos moleculares diferentes permitindo a caracterização e diferenciação das estirpes (Howe *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2005).

Inúmeros marcadores moleculares têm sido utilizados para realizar a diferenciação das estirpes de *T. gondii* pela amplificação de regiões específicas. O gene SAG1, localizado no cromossoma VIII, codifica a proteína de superfície mais importante do *T. gondii*, a P30, expressa somente em taquizoitos (Weiss, 1995; Bulow e Boothroyd, 1991). O gene

SAG2, localizado também no cromossoma VIII, codifica a proteína de superfície P22, expressa tanto em taquizoítos, como em bradizoítos (Howe *et al.*, 1997).

O gene SAG3, localizado no cromossoma XII, codifica proteínas expressas somente em taquizoítos, sendo a principal delas a P43 (Khan *et al.*, 2005).

2.5.2 Diagnóstico indirecto

As técnicas serológicas são utilizadas na detecção de anticorpos em soro de diversas espécies de animais, devido ao baixo custo em relação aos métodos baseados em DNA, e sua facilidade para o processamento de amostras em elevada quantidade comparativamente aos métodos parasitológicos directos (Meneses, 2016). A serologia é um dos principais métodos utilizados para estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose, pois baseia-se na pesquisa de anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, e, mais raramente, IgE) anti-*T. gondii* e de acordo com o perfil serológico apresentado pelo indivíduo pode-se determinar a fase da infecção (aguda ou crónica). Os testes serológicos mais comumente utilizados são a Reacção de Imunofluorescência Indirecta (RIFI); o Teste de Aglutinação Modificada (MAT); o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) convencional, de captura (IgM ou IgA) ou de avidéz para IgG; o Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA) e Immunoblotting (IB) (Remington *et al.*, 2005).

Para o diagnóstico da toxoplasmose, a técnica serológica considerada padrão de ouro é a reacção de Sabin-Feldman ou teste do corante (Kasper *et al.*, 2009), isto porque foi a primeira técnica que em 1948 Albert Sabin e Harry Feldman usaram para detectar anticorpos contra *T. gondii* em amostras biológicas de indivíduos. Esta descoberta foi um grande marco no estudo da toxoplasmose. O teste é caracterizado por ser altamente sensível e específico e sem evidências de resultados falsos negativos, por sua precisão é considerada o teste de referência, servindo como o parâmetro comparativo para validação de outros testes de diagnóstico (Owana *et al.*, 1999; Kasper *et al.*, 2009).

O teste serológico ELISA é usado para a detecção de anticorpos específicos no soro de indivíduos e animais com infecção por *T. gondii*. Esta técnica permite pesquisar anticorpos IgM e IgA que traduzem uma infecção precoce que aparecem entre 15 e 40 dias após a infecção e são importantes no diagnóstico da toxoplasmose congénita; anticorpos IgG que, independente dos seus níveis, não ajudam a detectar as infecções recentes e permanecem detectáveis pelo restante da vida dos indivíduos (Sensini, 2006).

O teste de RIFI baseia-se na aplicação do anticorpo ou antígeno que são ligados a um fluorocromo que, quando excitado por radiações UV, emite luz no espectro visível, permitindo detectar anticorpos da classe IgG ou IgM (Sevivas, 2011).

O teste de Aglutinação Modificada (MAT) é bastante usado pois é um teste com boa sensibilidade, especificidade, e simplicidade na sua execução e pode ser realizada em várias espécies animais (Dubey *et al.*, 2021).

O Teste de Aglutinação de Látex (LAT), possui uma diferencial importância devido ao baixo custo e simples manuseamento. Neste teste, as partículas de látex são revestidas por uma ligação covalente com antígenos solúveis da membrana e do citoplasma de *T. gondii* (Gomes, 2013). Desde os séculos passados este teste vem sendo usado para o diagnóstico da toxoplasmose, ou seja, de anticorpos contra o parasita *T. gondii*, devido a sua variabilidade, sensibilidade, especificidade e diagnóstico com precisão em comparação com a técnica serológica padrão de ouro (Teste de Corantes) (Gray *et al.*, 1990; Mohammed, 2019). O teste de LAT é um método laboratorial usado para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos contra *T. gondii* ou antígenos em uma variedade de fluidos corporais, incluindo o soro (Frank, 2019). O teste consiste em uma suspensão aquosa de partículas revestidas de poliestireno com antígenos purificados e solúveis de *T. gondii*, ocorrendo uma aglutinação quando os anticorpos estão presentes (Ghani, 2011).

Vários estudos usando a técnica de LAT já foram realizados e foram considerados como um teste de rastreio para o diagnóstico da toxoplasmose, especialmente em pequenos laboratórios, devido a sua disponibilidade, simplicidade, sensibilidade e especificidade (Sukthana *et al.*, 2001). Devido a sua alta sensibilidade e especificidade, vários autores recomendam o uso desta técnica para o diagnóstico de *T. gondii*. Num estudo feito por Mazumder *et al.* (1988) comparando este teste com o de Imunofluorescência não teve falsos-negativos.

2.6 Genética

Com base em análises moleculares através dos polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), *T. gondii* tem uma estrutura populacional incomum que consiste em três linhagens clonais predominantes (tipos I, II e III) (Sibley e Boothroyd, 1992; Howe, 1995). Foram reconhecidas 3 linhas na Europa e América do Norte (Darde,

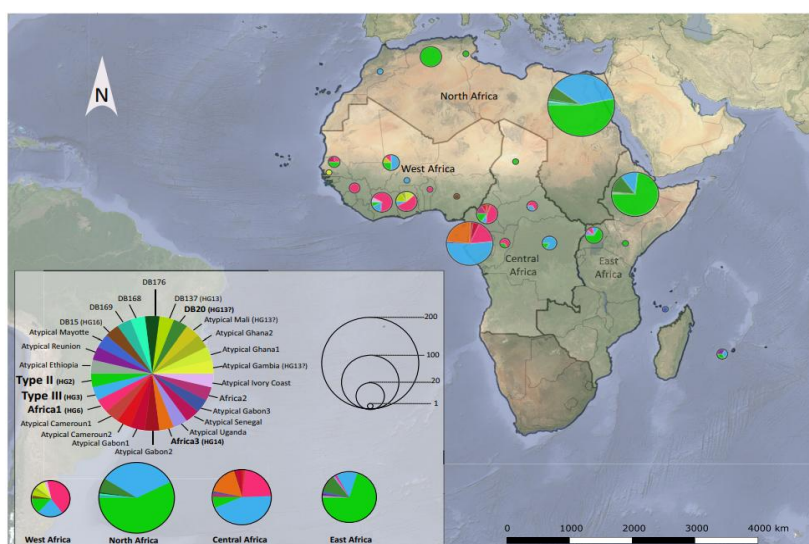
1996), das quais os isolados do tipo I eram altamente patogénicas em murganhos e possuíam uma diversidade genética muito limitada, independentemente da dose, e é o menos encontrado, enquanto os tipos II eram os mais frequentes, e mais relacionados com a reagudização da doença na imunodeficiência humana adquirida e infecções congénitas (Fuentes *et al.*, 2001; Boothryd, 2002; Simon *et al.*, 2019). Os tipos II e III são geralmente avirulentos para ratos e ocorrem principalmente em outros animais (Rey, 2001; WHO, 2014; Simon *et al.*, 2019). Estirpes que não se enquadravam nesses três tipos clonais eram anteriormente consideradas atípicas, mas um quarto tipo clonal foi recentemente reconhecido, principalmente na vida selvagem (Khan *et al.*, 2011).

O RFLP é um método rápido e de fácil execução (Ajzenberg *et al.*, 2005), que tem sido amplamente utilizado para a genotipagem do *T. gondii*. Este método detecta variações mínimas num gene, sendo que uma única substituição de bases pode originar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido pelas endonucleases de restrição (Singh, 1997). Marcadores de RFLP passam por amplificação pela reacção em cadeia da polimerase (PCR), seguido de digestão com enzimas de restrição específicas e visualização em gel de eletroforese (Sibley *et al.*, 2009). Howe *et al.*, em 1997, desenvolveram um sistema de genotipagem de *T. gondii* baseado na análise de restrição de fragmentos do gene SAG2, amplificado por nested PCR. Este método identifica genótipos de estirpes das três linhagens clonais descritas anteriormente.

Estudos sobre os polimorfismos genéticos e caracterização genotípica em diferentes isolados de *T. gondii* originados tanto de material humano quanto animal demonstram a existência de diversidade genética nesse parasita. Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas visando o estudo dessa diversidade genética entre diferentes isolados de *T. gondii* como a análise isoenzimática (Cristina *et al.*, 1995; Dardé 1996); amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD) (Guo e Johnson, 1995; Guo e Johnson 1996; Ferreira *et al.*, 2004); análise de microssatélites (Ajzenberg *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2004; Ajzenberg *et al.*, 2005) e polimorfismo por tamanho de restrição (RFLP) (Howe e Sibley, 1995; Cristina *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2006;). A genotipagem dos isolados deve ser simples, rápida, reprodutível, podendo ser utilizada em larga escala bem como ser capaz de detectar a diversidade genotípica de uma determinada espécie (Ajzenberg *et al.*, 2005).

Velmurugan *et al.* (2008) procederam a genotipagem de 19 isolados de *T. gondii* em África encontrando estirpes clonais do tipo II e tipo III. Esses autores sugerem que a mesma estrutura clonal encontrada na Europa e na América do Norte se repete em África.

Foi descrito num trabalho feito por Ajzenberg *et al.* (2009), que em África apesar da falta de dados, foram encontrados 2 genótipos, África 1 e África 2 em pacientes imunocomprometidos com toxoplasmose adquirida na Guiné e no Senegal, respectivamente. Para Mercier *et al.* (2010), os genótipos Africa 1 e Africa 3 foram descritos como sendo os novos genótipos circulantes nos países Africanos (Figura 6).



2.7 Prevenção

18

destruição dos cistos através da defumação, salga e cozimento da carne (Jones, 2009; Elmore, 2010). Os oocistos são quase indestrutíveis, mas os cistos teciduais são facilmente destruídos pelo congelamento e também pela fervura numa temperatura de 66°C (Dubey *et al.*, 1990; Kotula *et al.*, 1991).

Para os animais, foi produzida uma vacina que reduz ou elimina a formação de quistos nos tecidos. Esta vacina irá beneficiar os produtores e os consumidores de carne suína, visto que reduzirá o impacto negativo na saúde pública (Burrels *et al.*, 2015). Também foi desenvolvida uma vacina para ovelhas (TOXOVAX®), que no ano de 1993 estava disponível na Grã-Bretanha e Nova Zêlandia. Esta vacina usa os taquizoítos da estirpe S-48 que persiste nos tecidos dos animais e reduz a perda dos fetos (Buxton *et al.*, 1993). Os gatos são a chave da transmissão de *T. gondii*, por serem o hospedeiro definitivo. Um estudo feito por Dubey (1997) concluiu que a ausência de gatos está geralmente associada a uma baixa prevalência.

Ainda no âmbito da prevenção, convém manter os animais de companhia, como gatos, dentro de casa, alimenta-los com dieta preparada comercialmente, e limpar diariamente as caixas de areia e a remoção adequada das fezes, pois os oocistos necessitam de pelo menos 24 horas para esporular e se tornarem infectantes (Vollaire, 2009; Gangneux e Dardé 2012).

O solo e a água contaminados podem agir como veículos de transmissão de oocistos para vegetais e frutas de consumo, mas há poucos dados que confirmem esta informação (Dubey 2004, Gangneux e Dardé 2012).

A prevenção devia estar amplamente divulgada em doentes imunocomprometidos, pois estes doentes podem perder a vida devido a esta infecção.

Para Sevivas (2011), deve-se recomendar aos doentes imunocomprometidos, as mulheres grávidas e indivíduos susceptíveis atenção ao lavarem as mãos, ao manipular a carne crua, lavar bem as frutas e legumes e evitar o consumo de carne mal cozida bem como o contacto com gatos.

É recomendada a triagem serológica de todas as mulheres grávidas, estas devem evitar contacto com gatos e evitar limpar as caixas dos gatos. Caso o contacto for inevitável as mãos devem ser bem higienizadas ou usar luvas para fazer esta actividade. Após manusear carne crua lavadas cuidadosamente as mãos (Sevivas, 2011). Potenciais doadores de órgãos devem ser testados para evitar a propagação do parasita através de órgãos transplantados (Gangneux e Dardé 2012).

Recomenda-se igualmente evitar o hábito de coprofagia observado em alguns animais, bem como o controlo de insectos e roedores no ambiente. Deve-se igualmente, evitar o consumo e fornecimento aos animais, de carne crua ou leite cru de cabra, sendo indicado o uso de produtos ou alimentos comerciais disponíveis (Monteiro, 2010). As condutas de higiene pessoal devem ser rigorosamente seguidas, não devendo ser consumida e nem fornecida aos animais a água de lagos, poços e rios que não passem por um tratamento prévio. O acesso de cães e gatos a reservatórios de água, de lacticínios e frigoríficos, deve ser evitado (Breganó *et al.*, 2010).

Por esta doença ser negligenciada, deve-se fazer notificação dos surtos as autoridades competentes para melhor divulgação e conhecimento da toxoplasmose, visto ser uma doença importante para a saúde pública.

3 OBJECTIVOS

3.1 Objectivo geral

- Avaliar a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em roedores na zona rural do Parque Nacional do Limpopo (PNL)

3.2 Objectivo específico

- Determinar os perfis serológicos para *Toxoplasma gondii* em roedores do Parque Nacional do Limpopo
- Estabelecer PCR para a detecção de *Toxoplasma gondii*
- Caracterizar geneticamente as linhagens de *Toxoplasma gondii* circulantes no Parque Nacional Limpopo
- Avaliar a associação entre a serologia e as características dos roedores (espécie, habitat, idade, sexo)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no habitat rural do Parque Nacional do Limpopo (PNL), em Moçambique. O PNL está localizado a oeste da Província de Gaza, no distrito de Massingir e abrange uma área de aproximadamente 11.000 km². O parque está entre as seguintes coordenadas geográficas: latitude 22° 25' - 24° 10' S e longitude 31° 18' - 32° 39' E (Holden, 2001; Ministério da Administração Estatal, 2014). É delimitado por 190 km de fronteira internacional vedada com a África do Sul (Parque Nacional Kruger) a Oeste, pelos rios Limpopo (cerca de 260 km) e Elefantes (cerca de 85 km) a Leste e Sul, respectivamente. O PNL é uma área protegida de Moçambique e possui 13 aldeias situadas ao longo de três grandes rios, nomeadamente do rio Limpopo (aldeias Macaringue, Munhamane, Cunze, Chipanzo e Makhonguele); do rio Xingwedzi (aldeias Bingo, Machamba, Chimangue e Mavoze) e do rio dos Elefantes (aldeias Madingane, Mahlaúle, Chibotane, Machavule e Makwachane). As aldeias Machamba, Bingo e Mavoze estão localizadas dentro do PNL, enquanto as restantes aldeias estão localizadas ao longo do rio Limpopo (zona tampão), uma área ainda considerada dentro dos limites do parque. Esta zona tampão inclui assentamentos, terras agrícolas (cultura) e 70% da população pecuária do parque.

O PNL foi estabelecido a 27 de Novembro de 2001, mudando assim o estatuto e dimensões da antiga “Coutada 16”, uma área de caça adjacente ao rio Limpopo.

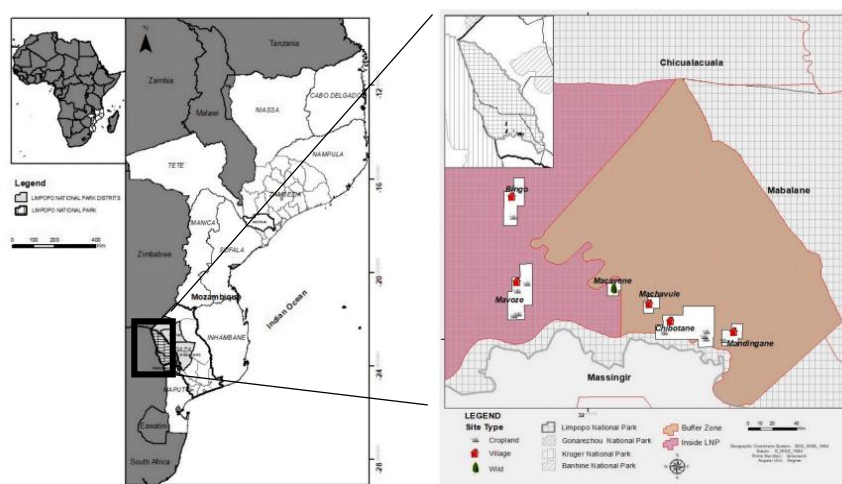


Figura 7: Localização do Parque Nacional do Limpopo e das aldeias onde foram feitas as colheitas.
Fonte: Mapaco et al. (2022)

A parte laboratorial foi realizada no laboratório do Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM), que se localiza no Campus da Faculdade de Veterinária, sito no bairro Luís Cabral, Avenida de Moçambique, Km 1.5, distrito de KaMubukwana, Cidade de Maputo.



Figura 8: Laboratório do Centro de Biotecnologia. Imagem ilustrando a realização do teste serológico LAT. Fonte: o Autor

4.2 Captura dos roedores

O seguinte protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da VetAgro-Suo em Lion, França (Comitê d'Ethique de VetAgro Sup n°18, Avis 1905) e a credencial para captura de roedores no PNL foi obtida da Administração Nacional de Áreas de Conservação de Moçambique (Credencial n° 1/02/2021).

A colheita dos roedores foi feita nas aldeias e nas machambas entre Maio e Novembro de 2019. A escolha dos locais de colheita baseou-se em dois critérios, uma selecção aleatória das casas e das machambas onde havia evidência de presença de cereais e com base nas informações colhidas pela população local sobre a presença de roedores e também a visualização dos sinais de roedores. Assim, foram incluídas no estudo as aldeias Chibotane, Machavule, Mavodze e Macavene.

Para a captura dos animais, foram utilizadas armadilhas de modelo Sherman e Mesh, usando como iscas frutas, farinha de amendoim e chouriço. As armadilhas foram dispostas em residências (nos cantos das casas aonde circulam os roedores), no solo, em galhos de árvores e em celeiros nas machambas. As mesmas foram colocadas ao final da tarde, em locais com indícios de passagem de roedores, como fezes, manchas de gorduras e trilhos, ou em locais com grande oferta de alimentos. Por dia, foram colocadas três (3) armadilhas em residências e machambas, e todos os locais foram vistoriados na manhã do dia seguinte.

As armadilhas do tipo Mesh são em forma de rede (Figura 9A) de porte pequeno que usa um mecanismo de anel deslizante para trancar a porta, com uma porta de abertura para o exterior do lado oposto que é necessária para activar a armadilha, são desenhadas para capturar roedores de tamanho maior. As armadilhas do tipo Sherman são feitas de chapa metálica, podem ser dobráveis ou não, com uma abertura para a entrada do animal e uma plataforma no fundo da armadilha que ao ser accionada pelo animal, esta fecha (Figura 9B) e são usadas para capturar roedores de pequeno tamanho como *Mus sp.* E *Crocidura sp.* Deve-se ter o especial cuidado de não deixar as armadilhas expostas ao sol, para evitar o aquecimento da chapa, resultando na morte do animal, mas tem a vantagem de proteger o animal contra a chuva e outros predadores (Dalecky *et al.*, 2017).

No momento da verificação das armadilhas, os roedores capturados foram contidos fisicamente, utilizando-se luvas de couro, acondicionados nas armadilhas e transportados até as instalações físicas da área de estudo e manejados para a colheita de material biológico no laboratório do PNL de acordo com as técnicas padrão descritas por Dalecky *et al.* (2017).

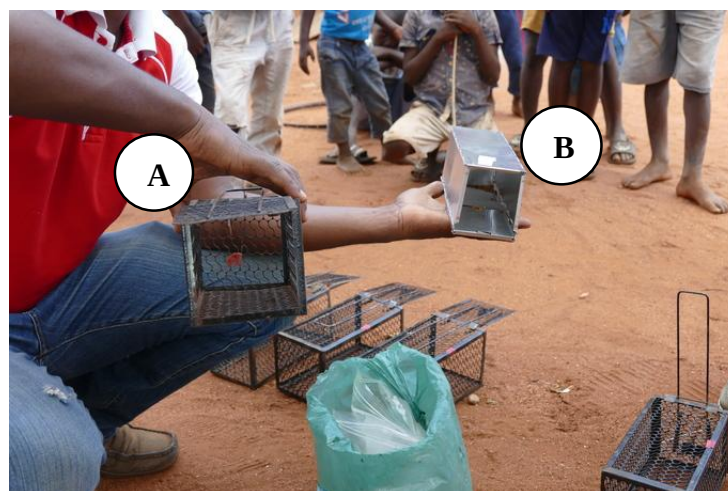


Figura 9: Armadilhas do tipo Mesh em (A) e do tipo Sherman em (B) montadas em machambas, em celeiros e nas residências. **Fonte:** o Autor

4.3 Identificação dos roedores

Para a identificação dos animais, usou-se a morfologia externa para identificar e agrupar os animais capturados por morfotipos a nível de género ou espécie. Estas características morfológicas foram usadas inicialmente para espécies de roedores de campo (Herbreteau *et al.*, 2011). Os animais foram agrupados e identificados segundo descrição literária e comparação com exemplares do Museu de História Natural da UEM.

As principais características externas consideradas para agrupar e identificar os animais foram:

- A forma e tamanho corporal.
- O comprimento e a textura da pelagem.
- A forma e tamanho da cabeça, orelha, cauda e membros posteriores.
- A coloração dorsal, ventral, dos membros, da cabeça e da cauda.
- A cobertura da cauda: com pelos ou sem pelos, com escamas ou anéis, tufada no fim.

As medidas externas são um ponto chave para diferenciar as espécies, segundo Teta e Yahat (2021), estas medidas são expressas em intervalos (mínimo e máximo). Para cada espécie são indicadas algumas medidas, CC: comprimento total é medido em linha recta vertebral da ponta do focinho à ponta da cauda; C: comprimento da cauda é medido desde o ponto de inserção do corpo até a extremidade distal; P: comprimento da pata; O: comprimento da orelha. Para orientação, foram considerados 4 grupos de tamanho, de acordo com o comprimento: pequeno (até 100 mm), médio (entre 101 e 150 mm), grande (151 e 230 mm).

4.4 Colheita de amostras para a detecção de DNA e anticorpos

No laboratório do PNL, os roedores foram retirados das armadilhas e introduzidos num saco *ziplock* contendo algodão humedecido com uma solução de Isoflurano na dose de 10mg/kg de peso vivo, para posterior eutanásia por inalação na cabine de segurança biológica classe II. Durante a colheita das amostras, foi usado material cirúrgico estéril (1 conjunto para cada animal) para evitar contaminação cruzada.

De seguida, procedeu-se a dissecação, colheita dos órgãos (cérebro, língua, coração e diafragma) colhidos para extração de DNA e posterior PCR e colheita de sangue intracardiaco imediatamente após a morte do animal para a detecção de anticorpos. As amostras foram conservadas em tubos eppendorfs no congelador a -40°C, no laboratório da PNL e posteriormente transferidas em gelo e conservadas a -80C no laboratório do Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM).

4.5 Detecção de anticorpos por meio do LAT

A detecção de anticorpos contra *T. gondii* em soro de roedores foi realizada no laboratório do CB-UEM. Para a detecção de anticorpos nas amostras de soro de roedores foi utilizado o kit PASTOREXTM TOXO. Foi seguida a metodologia recomendada pelo fabricante (Bio-Rad, França), conforme se descreve a seguir, de forma resumida. Inicialmente, foi agitada a solução de latex antes do uso, obtendo-se uma suspensão castanha. Em seguida, em cada uma das 8 cavidades do cartão fornecido no kit, foram colocados 15µl da amostra de soro de cada animal que foi examinado, adicionados uma gota do diluente e uma gota da suspensão látex e misturados com ajuda de uma vareta de agitação. Em cada cartão, foi incluído um controlo positivo e negativo, seguindo um procedimento similar.

O cartão foi colocado no agitador mecânico (60 RPM) e deixado a girar durante 5 minutos para que ocorresse a reacção de aglutinação. A leitura foi efectuada num limite temporal de 5 a 7 minutos, segundo os parâmetros estabelecidos pelo fabricante:

- Reacção negativa: suspensão castanha e homogénea, sem aglutinação, à semelhança do soro do controlo negativo;
- Reacção positiva: fundo verde com agregados vermelhos, evidenciado que a amostra de soro continha anticorpos específicos anti-*T. gondii*.

4.6 Extração de DNA de amostras de cérebro, língua, coração e diafragma

A extração de DNA foi realizada em órgãos provenientes de animais com amostras positivas no teste serológico, de acordo com as recomendações do fabricante do “kit” comercial QIAamp® DNA Blood and Tissue KIT (Qiagen, Germany). Para tal, os órgãos foram cortados e pesados 50 mg e foram ressuspensos em 180 µL de tampão de lise (ATL). Foram adicionados 20 µL de solução de proteinase K e as amostras incubadas em banho-seco a 56°C por 1 hora, seguida de incubação a 90°C por mais 1 hora. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto e adicionadas 2 µL de RNase A e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos. Seguidamente, foram adicionados aos microtubos, 200µL da solução de lise e 200µL de etanol 100%, que foram então homogeneizados durante 10 segundos. As amostras foram transferidas para colunas de purificação acopladas a tubos de colheita e submetidas à centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Os resíduos resultantes foram descartados, sendo em seguida adicionados 500 µL de tampão de lavagem (AW1) às colunas, que foram novamente centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto. Nesta etapa, os resíduos foram descartados e realizada a adição de 500 µL de tampão de lavagem (AW2) às colunas, que foram homogeneizadas e submetidas à nova centrifugação. Após o descarte dos resíduos, as colunas foram transferidas para novos microtubos de 1,5ml, aos quais foram adicionados 100 µL de tampão de eluição (TE) e, após 5 minutos de incubação, centrifugadas a 13.000 rpm por mais 5 minutos. O DNA extraído foi identificado com data do processamento e o código da extração e mantido a -20°C.

4.7 Detecção molecular de *T. gondii*

Para detectar a presença de *T. gondii* em amostras de DNA de roedores, foi usado um nested PCR multiplex usando para 3 marcadores microssatélites SAG1, SAG2b e SAG3 segundo (Khan et al., 2005, Su et al., 2006, Kasper et al., 2009) para cada amostra. Para o PCR primário com primers externos (Tabela1), foram usados 25 µl de reacção contendo 1x KAPA Fast multiplex 2G, 2,5 µM de cada primer (reverse e forward para cada marcador), e 1,5 µl do DNA das amostras. O processo de amplificação foi feito usando um termociclador 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA), com a seguinte programação: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, pareamento dos primers a 58°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, por fim culminando com um período de extensão final

a 72°C por 10 minutos. Os produtos resultantes da PCR primária foram diluídos na proporção de 1:1 com água destilada e usados como amostra para o PCR secundário.

O PCR secundário foi igualmente feita em 25 µl de mistura de reação contendo as mesmas concentrações de reagentes, mas usando KAPA2G Robust HotStart ReadyMix e os primers internos de cada marcador microssatélite (Tabela 1). Este PCR secundário obedeceu a mesma programação de termociclador exceptuando a temperatura de pareamento de primers que foi de 60°C. Os *amplicons* resultantes foram separados por electroforese em gel de agarose (1,5%) corado com Brometo de etídio (0,5mg/ml) e visualizados sob luz ultravioleta para digitalização em fotografia.

Tabela 1. Marcadores microssatélites de sequências SG1, SG2 e SG3 incluindo os tamanhos de pares de base, as enzimas de restrição utilizadas para caracterização por PCR-RFLP e as referências utilizadas.

Marcador	Primers do PCR Multiplex (primers externos)	Primers do Nested PCR (primers internos)	Amplicom (bp)	Enzimas de restrição	Referência
SAG1	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I/ (Cfr13I) + HaeII/ (BfoI)	Grigg <i>et al.</i> (2001)
SAG2B	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCACTGTTGTCCAGGGTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTCGACCAGCGGGAGCAC	546	HinfI + TaqI	Khan <i>et al.</i> (2005); Su <i>et al.</i> (2006)
SAG3	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	NCII/ (BCNI)	Grigg <i>et al.</i> (2001)

4.8 Análise estatística

Foi usado o teste Qui-quadrado e o teste de Kruskal-Wallis para verificar a relação entre a ausência ou presença de anticorpos contra *T. gondii* com as variáveis sexo, localidade e espécie do roedor.

5 RESULTADOS

5.1 Amostragem de roedores capturados positivos ao *T. gondii* no PNL

No presente estudo, foram analisadas 161 amostras de soro de várias espécies de roedores capturados nas quatro aldeias do PNL. A espécie dominante foi *Mastomys natalensis* nas machambas, nas aldeias foi a espécie *Rattus rattus*, e no bosque foram capturadas as espécies *Georbilliscus leucogaster* e *Saccostomus campestris* (Tabela 2).

Tabela 2: Número de amostras por espécie de roedor e área de amostragem em cada aldeia.

Espécie	Chibotane			Macavene		Machavule		Mavoze			Total
	Machamba	Vila	Total	Bosque	Total	Vila	Total	Vila	Machamba	Total	
<i>G. leucogaster</i>				1	1						1
<i>M. natalensis</i>	58	9	67						29	29	96
<i>R. norvegicus</i>						2	2				2
<i>R. rattus</i>		12	12			23	23	13		13	48
<i>S. campestris</i>	5		5	3	3			1	1	2	10
<i>T. paedulus</i>		2	2			2	2				4
Grand Total	63	23	86	4	4	27	27	14	30	44	161

5.2 Perfil serológico detectado pelo teste LAT.

Do total de soros testados acima mencionados, foram analisadas usando a técnica de LAT, 71 amostras revelaram a presença de anticorpos contra *T. gondii* perfazendo uma seroprevalência no estudo de 44.1% (71/161) - figura 10.

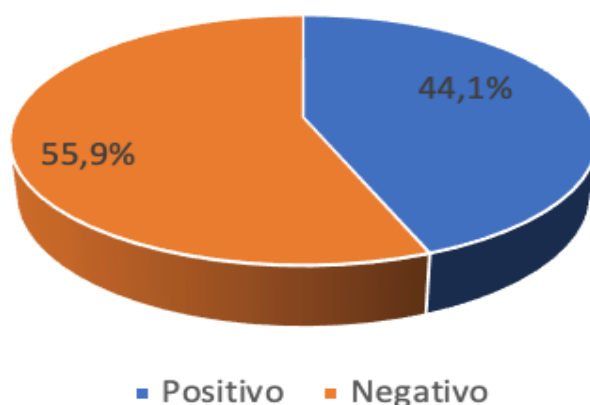


Figura 10: Prevalência de anticorpos anti *T. gondii* de soros de roedores testados usando o teste aglutinação em látex (LAT)

Dentre as 71 amostras positivas 67.6% (48/71) provinham de fêmeas e 32,4% (23/71) de machos (Figura 11).

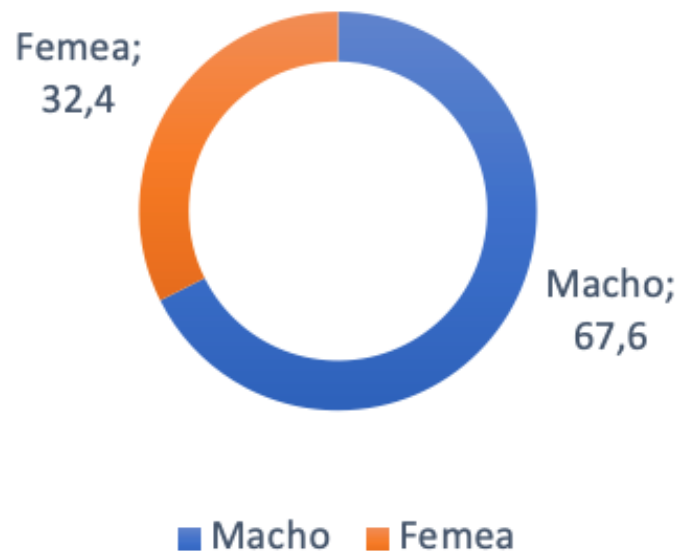


Figura 11: Percentagem das amostras detectadas positivas pelo teste aglutinação em látex (LAT) em função do sexo dos animais testados.

Dos 71 roedores seropositivos, verificou-se uma maior contribuição para o número de positivos pela espécie *Mastomys natalensis*, 67.6 % (48/71), seguida da espécie *Rattus rattus* com 19.7% (14/71). A espécie *Saccostomus campestris* contribuiu com 8,4% (6/71). Por sua vez as espécies *Geerbilliscus leucogaster*, *Rattus norvegicus*, *Thallomys paedulcus* ficaram com 1.4% (1/71) cada (Figura 12).

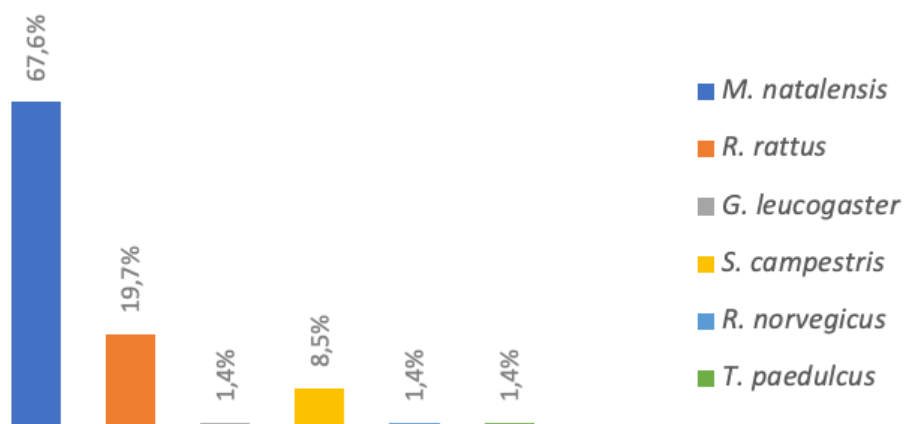


Figura 12: Percentagem das amostras dectetadas positivas pelo teste aglutinação em látex (LAT) em relação as espécies dos roedores. Legenda: G. leucogaster- Geerbilliscus leucogaster, M.natalensis- Mastomys natalensis R.

norvegicus- *Rattus norvegicus*, *R. rattus*- *Rattus rattus*, *S. campestris*- *Saccostomus campestris*, *T. paedulus*-
Thallomys paedulus.

Dentre as aldeias amostradas das 71 amostras de soro positivas, Chibotane com 52.1% (37/71) nas machambas e 12.7% (9/71) vila; a aldeia de Mavodze com 18.3% (13/71) na machamba e 7.0% (5/71) vila; a aldeia de Machavule, com 7.0% (5/71) na vila; e por fim a aldeia de Macavene foram colhidos roedores na floresta 2.8% (2/71) – Tabela 2.

Tabela 3: Distribuição das espécies por localidade do PNL e presença de anticorpos

Espécie	Chibotane			Macavene		Machavule		Mavoze			Total
	Machamba	Vila	Total	Bosque	Total	Vila	Total	Machamba	Vila	Total	
<i>G. leucogaster</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>M. natalensis</i>	32	3	35	0	0	0	0	13	0	13	48
<i>R. norvegicus</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
<i>R. rattus</i>	0	6	6	0	0	3	3	0	5	5	14
<i>S. campestris</i>	5	0	5	1	1	0	0	0	0	0	6
<i>T. paedulus</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
Total	37	9	46	2	2	5	5	13	5	18	71

Na análise estatística, não se verificou diferenças significativas entre as variáveis estudadas. Para a variável sexo, não houve diferenças significativas entre os dois grupos (macho e fêmea) em relação a ausência e presença de anticorpos contra *T. gondii* pois o *P* value (0.5) foi maior que o nível de significância estabelecido (0.05) usando o teste de Qui-quadrado. Devido ao reduzido número de amostras processadas para as variáveis localidade e espécie ($n < 2$), não foi possível fazer um teste Qui-quadrado. Alternativamente, foi possível realizar-se o teste de Kruskal-Wallis, onde para a variável localidade não foi notória uma diferença significativa em relação a ausência e presença de anticorpos, pois o *P* value (0.1) foi maior que o nível de significância (0.05). Para a variável espécie notou-se igualmente que não há diferenças significativas entre as espécies em relação a ausência e presença de anticorpos contra *T. gondii*, isto porque o *P* value (0.08) foi maior que o nível de significância (0.05).

5.3 PCR

Para a realização do teste molecular foram utilizados 3 marcadores satélites SAG1, SAG2 e SAG3 para a genotipagem do *T. gondii* por PRC-RFLP nas 30 amostras de DNA extraídas de uma mistura dos órgãos dos roedores que foram positivos no teste serológico (LAT). Apenas 1 roedor *Mastomys natalensis* teve resultado positivo (Tabela 3 e Figura

13) para *T. gondii* ao marcador molecular SAG1. A figura 13, apresenta o resultado obtido através da PCR-RFLP.

Tabela 3: Frequência de detecção dos 3 marcadores moleculares testados atravez do PCR-RFLP para genotipagem do *T.gondii* das 30 amostras positivas no teste serológico.

Multiplex nested PCR-RFLP			
Marcador genético	SAG1	SAG2b	SAG3
Amostras amplificadas	1/30(3,3%)	0	0

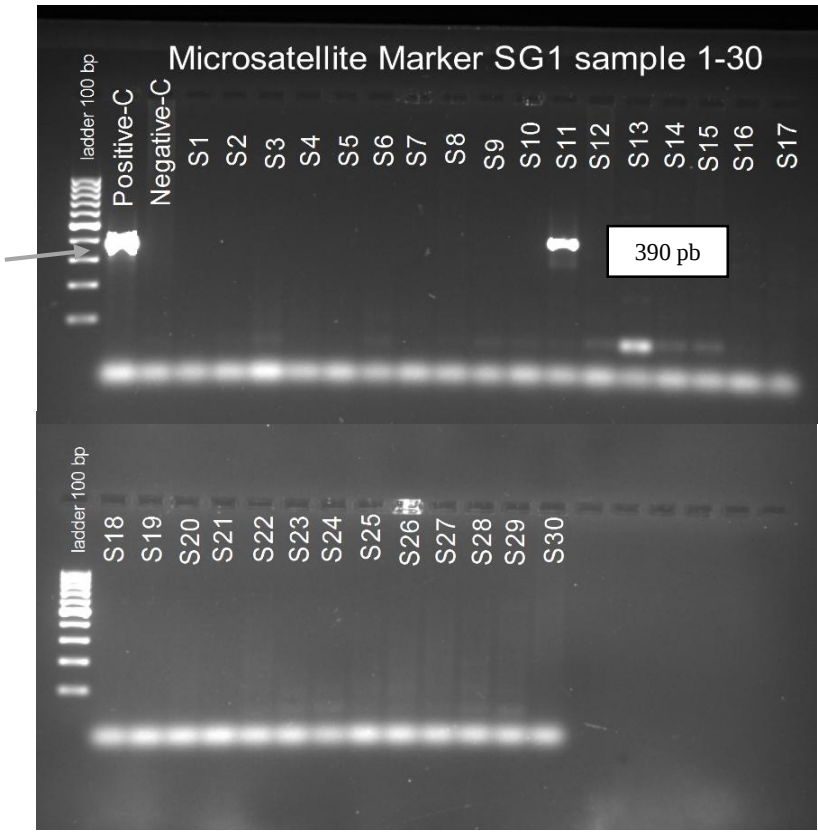


Figura 13: Legenda- Gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio visualizando produtos de PCR amplificados por marcador satélite, controlo positivo- *T.gondii*, controlo negativo- água destilada, amostra S11 positiva para SAG1, amostra S1; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30.

6 DISCUSSÃO

A rápida disseminação do *T. gondii* está associada à grande diversidade de hospedeiros, à capacidade de sobrevivência em diversos habitats e à transmissão entre hospedeiros intermediários e à morbidade e mortalidade tanto nos humanos como nos outros animais. Este facto, torna o *T. gondii* um parasita extremamente importante do ponto de vista de saúde pública. A avaliação da infecção por *T. gondii* nos roedores tem-se revelado de grande importância pois estes são conhecidos como hospedeiros amplificadores de parasita e são as principais fontes de infecção, tanto para os gatos como para os humanos, principalmente nos casos em que se verifique o consumo directo destes pelas populações humanas (Rabiee, 2018).

Determinar a ocorrência de anticorpos em roedores é de grande importância, pois por um lado, a detecção destes serve como um indicador da presença do parasita no meio ambiente e por outro lado contribui para a estimativa do risco de infecção para os humanos (Valverde, 2015).

A percentagem de amostras com anticorpos contra *T. gondii* obtidas no presente trabalho foi de 44.1%, e pode ser considerada alta em comparação com pesquisas realizadas em outras partes do globo. Estudos realizados no Senegal e no Níger, reportaram prevalências baixas de 4% e 1.96%, respectivamente (Mercier, et al., 2013; Brouat et al., 2018). Prevalências baixas de anticorpos são esperadas em climas com temperaturas baixas, pois são pouco adequados para a sobrevivência e esporulação de oocistos, diminuindo a probabilidade de contaminação ambiental (Galeh et al., 2020). Estas baixas prevalências podem estar relacionadas com o clima árido que esses países possuem enquanto que o clima na zona de estudo é semi-árido. A infecção por toxoplasmose é predominante em países de clima tropical e o índice de contaminação está relacionado ao baixo nível socioeconómico, à qualidade da água e ao saneamento básico (Bártholo et al, 2015). Um estudo feito na Nigéria revelou uma alta prevalência de toxoplasmose, 76.2%, pelo método de PCR. Este facto, pode ser devido ao clima húmido e tropical da área em estudo (Ode et al., 2022) como referido anteriormente.

Os resultados obtidos no presente estudo, podem ser comparados aos de Ahmad et al. (2012) que tiveram uma seroprevalência de 52% usando o LAT em roedores capturados na cidade de Lahore, no Paquistão. Vários artigos relatam que as prevalências de *T. gondii* apresentam diferenças substanciais. Foi reportado um caso de alta prevalência com a percentagem de 86,01% em roedores testados serologicamente pelo método de ELISA

num estudo feito no Irão (Claveria e Sabilay, 2006; Bahadori, *et al.*, 2019), enquanto que noutros estudos as prevalências são muito baixas de 0,46%-2% em roedores circulantes em diferentes países (Mercier *et al.*, 2010; Muradian *et al.*, 2012). Os valores de prevalência estão principalmente associados aos níveis de higiene, à abundância dos hospedeiros definitivos (os gatos), aos hábitos alimentares de vários países (Ruffolo *et al.*, 2016), a sensibilidade dos testes serológicos (Ntungwa *et al.*, 2024).

Estudos realizados usando o teste de LAT mostraram que o mesmo é um indicador confiável de infecção tanto em animais e humanos. Em humanos alguns estudos reportaram sensibilidade de 91,4%-95,8% (Balfour *et al.*, 1982; Holliman, 1990) e para suínos 45,9%-47,9% (Dubey *et al.*, 1995). Neste estudo, obteve-se uma percentagem de 44.1%, de soros positivos de roedores capturados no PNL, usando o teste LAT (PASTOREX™ TOXO) para detecção de *T. gondii*.

Em relação às percentagens de machos e fêmeas, foi observada uma maior percentagem de anticorpos nos machos. Resultados identicos foram obtidos por Galeh *et al.* (2020) num estudo, onde concluíram que de um modo geral os machos têm períodos de vida maiores do que as fêmeas, tendo por isso maior probabilidade de adquirir a infecção por *T. gondii*.

No presente estudo, a maior ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* foi observada em roedores da espécie *M. natalensis* com 67.6% (48/71) seguida da espécie *Rattus rattus* com 19.7% (14/71). Em um estudo realizado por Ruffolo *et al.* (2016), em São Paulo, foi relatada a espécie *Rattus rattus* como a espécie de maior ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* (4.9%), porém, usando a técnica de RIFI. A espécie *Saccostomus campestris* apresentou uma percentagem de positividade de 8.4% (6/71). A menor percentagem foi obtida nas espécies *Rattus norvegicus*, *Tallomys paedulcus* e *Gerbilliscus leucogaster* todas com 1.4% (1/71). Em outro estudo mais recente, realizado por Dellarupe *et al.* (2019), que visava descrever a ocorrência de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em espécies de roedores sinantrópicas na Argentina, usando a técnica de IFAT, foi observada uma maior ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* nas espécies *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*. De salientar que estas espécies são as mais encontradas e as mais pesquisadas no que diz respeito a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii*.

As espécies do género *Mastomys natalensis* e a espécie *Rattus rattus* que apresentaram a maior ocorrência de anticorpos no presente trabalho, são espécies sinantrópicas, isto é, espécies que directa ou indirectamente convivem com o homem, adaptando-se melhor as condições criadas pelo homem (Skinner e Chimimba, 2005).

As espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* apresentam altas percentagens de anticorpos contra *T. gondii*, pois estas espécies, para além de serem altamente prolíficas, têm uma esperança média de vida de 12 e 24 meses, respectivamente (Skinner e Chimimba, 2005), factos esses que asseguram a manutenção do agente no ambiente durante a época de baixa transmissão, por pelo menos um ano. Aliando a esperança média de vida destes animais com a alta prolificidade e o crescimento exponencial destes animais em condições de alimentação, água e abrigo disponíveis, pode-se afirmar que estes roedores constituem fortes candidatos a hospedeiros reservatórios de parasitas incluindo o *T. gondii* (Neiva, 2005; Motazedian *et al.*, 2010). Contudo, no presente estudo, a espécie *Rattus norvegicus* apresentou uma baixa percentagem de anticorpos contra *T. gondii* e um menor número de roedores capturados. No presente estudo, a baixa percentagem de anticorpos observada nas espécies *Rattus norvegicus*, *Tallomys paedulus*, e *Geerbilliscus leucogaster* pode estar relacionada com o período de captura dos animais, pois quando estes são capturados numa fase inicial da infecção por *T. gondii*, dificilmente são detectados anticorpos contra o mesmo parasita (Hosseini *et al.* 2021), pese embora este facto não poder ter sido aprofundado, visto que não foi possível determinar se a exposição foi recente ou não com o método de LAT.

Todos os roedores que apresentaram anticorpos contra *T. gondii* são de hábito terrestre, que habitam em plantações nas machambas ou nas residências (Bonvicino *et al.*, 2014). Os mamíferos terrestres são significativamente mais expostos ao *T. gondii* do que mamíferos que são parcialmente terrestres ou arborícolas (De Thoïs *et al.*, 2003), uma vez que nos mamíferos terrestres existe a probabilidade de infecção com oocistos de *T. gondii* presentes no solo ou na água contaminada. Adicionalmente, a via de transmissão congénita também deve ser considerada, principalmente nos roedores (Marshall *et al.*, 2004, Júnior, 2017; Dabritz *et al.*, 2008).

Em relação às aldeias estudadas, não foram encontradas variações significativas nas comunidades de roedores para anticorpos contra *T. gondii* detectados e era o esperado, como resultado, elevadas prevalências nas aldeias estudadas, visto que as características ecológicas do habitat (nas residências, nos celeiros e nas machambas) onde se fez a colheita serem similares em todos os aspectos. Este facto, é sustentado por Brouat (2018), que refere que em zonas de pastoreio agrícola e nos campos de irrigação existe maior diversidade de roedores devido à existência de alimentos.

Embora o diagnóstico laboratorial convencional da toxoplasmose ainda se baseie em parâmetros serológicos como a presença de IgM, IgA e IgG anti-*T.gondii*, a reacção em

cadeia de polimerase (PCR) tem sido utilizada desde a década de 90 com o objetivo de melhorar a sensibilidade do diagnóstico, para além de torná-lo mais rápido e menos laborioso (Okay *et al.* 2009; Alfonso *et al.* 2009; Ghani, 2011).

Neste estudo, 30 amostras de tecidos de roedores, provenientes de animais com soros positivos à presença de anticorpos contra *T. gondii*, foram usadas para detectar e caracterizar *T.gondii*, usando o teste molecular multiplex nested PCR-RFLP. Apesar da frequência relativamente alta de anticorpos anti-*T. gondii*, apenas 1 das amostras foi positiva ao teste de multiplex PCR. Este facto pode ser devido ao uso do teste LAT apanhar a IgM e a IgG, e o PCR necessita o DNA ou partícula do parasita, o DNA pode ter perdido a sua qualidade ou a sua integridade, o DNA pode não ter sido bem conservado e apresentar contaminantes que interferem no PCR. Para a caracterização genética da amostra positiva foi realizada o PCR-RFLP. Este resultado foi similar ao estudo realizado por Muradian (2009), que obteve 1 animal positivo para o *T.gondii* pelo nested PCR-RFLP depois deste animal ter sido negativo ao teste de bioensaio, que referiu que este facto pode ser devido a baixa concentração do DNA.

Dellarupe (2014), na Argentina, detectou em 3,3% (4/123) das amostras do sistema nervoso central de roedores e duas amostras foram genotipadas por nested PCR-RFLP. Obteve um resultado similar ao que foi achado neste estudo com roedores rurais do PNL, isto é, das 30 amostras positivas ao teste LAT, apenas uma amostra foi detectada positiva no multiplex-PCR, estes resultados sugerem não haver consistência entre a positividade serológica e positividade determinada por PCR apesar do PCR ter sido padronizado no CB.

No presente estudo, a genotipagem por multiplex PCR foi possível em uma (n=30; 3%) amostra positiva e que pertencia a um animal da espécie *Mastomys natalensis*. Num estudo realizado na China (Yan *et al.*, 2014) detectaram uma percentagem de 22,6% em roedores da espécie *Mus musculus* que são predominantes em áreas urbanas, devido ao crescimento populacional desordenado e problemas de saneamento básico que oferecem condições ideais para o estabelecimento de populações de roedores sinantrópicos, enquanto o estudo em causa foi realizado num parque nacional com zonas de regadio e onde se encontram mais roedores da espécie *Mastomys sp.*

A análise genética do locus SAG1, SAG2 e SAG3 realizada para determinar genótipos de *T. gondii* utilizando a técnica de multiplex PCR, foi positiva para o marcador SAG1. Um estudo feito por Elamin (2014) na Arábia Saudita foi positivo para o marcador SAG2, onde 59,1% eram do tipo II, 31,8% eram do tipo III e 9,1% eram de genótipo

desconhecido. Outro estudo feito na Argentina por Dellaupe (2019), reportou que 2 amostras foram genotipadas com sucesso e todas do alelo tipo III para todos os marcadores estudados, exceto para SAG1. Em concordância com o outro estudo feito em suínos por Mondragon *et al.* (1998), relataram que o genótipo tipo II foi de longe o mais prevalente, representando 83,7% dos isolados e o genótipo tipo III foi identificado em apenas 16,3% dos isolados. O genótipo tipo I não foi identificado nos isolados de suínos. O *T. gondii* tem uma estrutura populacional incomum que consiste em três linhagens clonais predominantes os tipos I, II e III (Sibley e Boothroyd, 1992; Home, 1995), dos quais os isolados do tipo I eram altamente patogênicos em murganhos e possuíam uma diversidade genética muito limitada, independentemente da dose, enquanto os tipos II são os mais frequentes, e mais relacionados com a reagudização da doença na imunodeficiência humana adquirida e infecções congênitas (Fuentes et al., 2001; Boothroyd, 2002). O tipo I é o menos encontrado, e o tipo III é geralmente avirulento para ratos e corre principalmente em outros animais (Rey, 2001; WHO, 2014).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, associando técnicas serológicas e moleculares, demonstram que os roedores do Parque Nacional de Limpopo possuem anticorpos contra *T. gondii* usando a técnica serológica LAT, que estes jogam um papel importante na cadeia epidemiológica de *T. gondii* e representam um risco para a saúde pública.

Com o trabalho foi possível obter uma alta prevalência da toxoplasmose em roedores, onde a espécie *Mastomys natalensis* foi a que apresentou maior seropositividade.

Adicionalmente os resultados moleculares, SAG1 foi o único marcador genético positivo dos 3 marcadores usados, este genótipo de *T. gondii* circulantes indica claramente a circulação deste parasita no parque.

Referir que estes resultados fornecem dados preliminares para futuras abordagens em epidemiologia da toxoplasmose no Parque.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso, Y.; Fonseca, C.; Jiménez, N.; Pinillos, T.; Contreras, A. J. D.; Cox, R.; Capó, V.; Pomier, O.; Bandera, F.; Ginorio, D. 2009. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Res.* 6:2
- Ajioka, J. W.; Fitzpatrick, J. M.; Reitter, C. P. 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. ISSN 1462-3994
- Aguirre, A. A.; Longcore, T.; Barbieri, M.; Dabritz, H.; Hill, D.; Klein, P. N.; Lepczy, C.; Lilly E. L.; McLeod, R.; Milcarsky, J.; Murphy, C. E.; Su, C.; VanWormer, E.; Yolken, R.; Sizemore, G. C. 2019. The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth* 16, pages378–390
- Ahmad, M.S., Maqbool, A., Mahmood-ul-Hassan, M., Anjum, A.A.2012. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Human Beings and Commensal Rodents Trapped from Lahore, Pakistan. *The Journal of Animal & Plant Sciencies*, 22 (1): 51-53
- Ajzenberg, D.; Banuls, A.L.; Tibayrenc, M.; Dardé, M.L. 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 32: 27–38
- Ajzenberg, D.; Dumétre, A.; and Darde´ M. 2005. Multiplex PCR for Typing Strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of clinical microbiology*, p. 1940–1943 Vol. 43, No. 4
- Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F. 2009. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *The Journal of Infectious Diseases* 199: 1155–1167
- Ajzenberg, D.; Collinet, F.; Mercier, A.; Vignoles, P.; Dardé, M. 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay. *Journal of clinical microbiology*, Dec.p.4641–4645Vol. 48, No. 12

- Bahadori, E. S.; Sadraei, J.; Dalimi, A. 2019. New prevalence surveillance of *Toxoplasma gondii* among rodents and stray cats by ELISA avidity and nested PCR methods, Northeast of Iran; J Parasit Dis 43(3):360–367
- Balfour, A.H., Fleck, D.G., Hughes, H.P., Sharp, D. 1982. Comparative study of three tests (dye test, indirect haemagglutination test, latex agglutination test) for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human sera. Journal of clinical pathology, 35:228-232
- Bártholo, B.B.; Monteiro, D.L.; Trajano, T.J.; Jesus, N.R. (2015). Toxoplasmose na gestação. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, [S.L.], 14(2), 65-70, Universidade de Estado do Rio de Janeiro
- BIO-RED: kit PASTOREXTM TOXO. (2014). Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human serum by latex particle agglutination. Ref. 72724: Manufacturing Company, França
- Bonvicino, C.R.; Lazar, A.; Corrêa, M.O.; Weksler, M.; Paula, A.C.; Bezerra, A.M.R. 2014. Conservation units in the core área of the Cerrado domain: an overview on the small nonvalant mammals (Rodentia and Didelphimorphia). *Heringeriana*, 8 (2): 202-221
- Boothroyd, J. C.; Grigg, M. E. 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Current Opinion in Microbiology*, 5:438–442
- Boothroyd, J.C.; Nagel, S.D.; Burg, J.L.; Perelman, D. 1987. Molecular Approaches to the Study of *Toxoplasma gondii*. In, *Contemporary Issues in Infectious Diseases*, Sande, M.A., Leech, J.H. and Root, R.K. (eds.), Vol. 7. Churchill-Livingston
- Boughattas, S.; Abdallah, R.; Siala, E.; Aoun, K.; Bouratbine A. 2011. An atypical strain associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia; *New microbiologica*, 34, 413-416
- Breganó, M.R.; Mori, L.F.M.R.; Navarro, I.T. 2010. Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas Londrina: EDUEL
- Brouat, C.; Diagne, C. A.; Ismaïl, K.; Aroussi, A.; Dalecky, A.; Bâ, K.; Kane, M.; Niang, Y.; Diallo, M.; Sow, A.; Galal, L.; Piry, S.; Dardé, M. L.; Mercier, A. 2018.

- Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in commensal rodents sampled across Senegal, West Africa Parasite 25, 32; published by EDP Sciences
- Burg, J. L.; Grover, C. M.; Pouletty, P.; Boothroyd, J. C. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, v. 27, p. 1787-1792
 - Burrells, A.; Benavides, J.; Cantón, G.; Garcia, J.; Bartley, P.; Nath, M.; Thomson, J.; Chianini, F.; Innes, E.; Katzer, F. 2015. Vaccination of pigs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii* – safer meat for human consumption Veterinary Research (2015) 46:47 DOI 10.1186/s13567-015-0177-0
 - Bulow, R.; Boothroyd, C. 1991. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes. The Journal of immunology. The American Association of Immunologists Vol. 147, 3496-3500, No. 10
 - Buxton, D., Thomson, K.M., Maley, S., Wright, S., Bos, H.J. 1993. Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine. Vet. Rec. 133, 310–312
 - Caldart, E.T.; Freire, R.L.; Ferreira, F.P.; Ruffolo, B.B.; Sbeghen, M.R.; Mareze, M.; Garcia, J.P.; Breganó R. M.; Navarro, I.T. 2017. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania)* amazonensis. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 26 (1): 17-27
 - Castro, F.C.; Castro, M.J.B.V.; Cabral, A.C.V.; Filho, G.B.; Vitor, R.; Lana, A.M.A, Andrade, G.M.Q. Comparação dos Métodos para Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita. Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia. v.23, n. 5, p.277-282, 2001
 - Chiebao D. P.; 2016. Diversidade genética de *Toxoplasma gondii*. Pesquisa & Tecnologia, vol. 13, n. 1
 - Cunha, M. M. 2014. Caracterização molecular de amostras de *Toxoplasma gondii* isoladas de animais natural e experimentalmente infectados e de amostras clínicas. Universidade federal de minas gerais – UFMG
 - Cristo, A. K.; Britto, C.; Fernandes, O. 2005. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão Molecular diagnosis of toxoplasmosis: review. J Bras Patol Med Lab, v. 41, n. 4, p. 229-35

- Cristina, N.; Dardé, M. L.; Boudin, C.; Tavernier, G.; Alexandre, M. P. ; Thomas, P A. 1995. A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups; Parasitol Res. 1995;81(1):32-7
- Dabritz, H. A.; Miller, M. A.; Gardner, I. A.; Packham, A. E.; Atwill, E. R. 2008. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Rodents from Central Coastal California and a Review of *T. gondii* Prevalence in Rodents. Journal of Parasitology, 94(3): 675-683
- Dalecky, A. A.; Bâ, K.; Piry, S. S.; Lippens, C.; Diagne, C. A.; Kane, M.; Sow, A.; Diallo, M.; Niang, Youssoupha.; Konecny, A. 2017. Range expansion of the invasive house mouse *Mus musculus domesticus* in Senegal, West Africa: a synthesis of trapping data over three decades, 1983–2014. Mammal Review, Wiley, 2015, 45 (3), pp.176-190
- Dellarupe, A.; Fitte, B.; Pardini, L.; Campero, L. M.; Bernstein, M.; Robles, M. del R.; Moré, G.; Venturini, M. C.; Unzaga, J. M. 2019. Infection in IH and DH can be acquired vertically by transplacental passage of parasites (tachyzoites), *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in synanthropic rodents from Argentina Infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em roedores sinantrópicos da Argentina. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 113-118
- Dardé, M.L.; Ajzenberg, D.; Su, C. 2014. Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*. Elsevier Ltd. Second Edition
- DeFeo, M.L.; Dubey, J.P.; Mather, T.N.; Rhodes, R.C. 2002. 3rd. Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. Am J. Vet. Res;63(12):1714-1717
- De Thoïs, B.; Demar, M.; Aznar, C.; Carme, B. 2003. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. Journal of Wildlife Diseases, 39(2), pp. 456–459
- Dubey, J. P.; Beattie, C. P. 1988. Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 1-177
- Dubey, J.P.; Thulliez, P. 1993. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. American Journal Veterinary Research, V.54, n. 2, p 270-273

- Dubey, J. P.; Weigel, R. M.; Siegel, A. M.; Thulliez, P.; Kitron, U. D.; Mitchell, M. A.; Mannelli, A.; Pinilla, N. E.; Shen, S. K.; Kwok, C. H.; Todd, K. S. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. J. Parasitol., 81(5), 1995, p. 723-729. American Society of Parasitologists
- Dubey, J.P. 1996. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. Vet Parasitol, v.64, p.65-70
- Dubey, J.P. 1997. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Parasitol. 83, 755–757
- Dubey, J.P.; Frenke, J.K. 1998. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. Veterinary Parasitology 77 1–32
- Dubey J.P.; Lappin M.R. 2006. Toxoplasmosis and neosporosis, In: Greene C.E. (Ed.), Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3rd ed. Elsevier, St Louis. p.754-775
- Dubey, J.P. 2007. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. Elsevier Ltd. 145, 45–50
- Dubey, J.P. 2009. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii* International Journal for Parasitology. Volume 39, Issue 8, Pages 877-882
- Dubey, J.P.; Lindsay, D. S.; Lappin, M. R. 2009. Toxoplasmosis and Other Intestinal Coccidial Infections in Cats and Dogs. Vet Clin Small Anim 39. 1009–1034
- Dubey, J., 2010, Toxoplasmosis of animals and humans, 2nd edition., CRC Press, Boca Raton, FL
- Dubey, J. P.; Lago, E.G.; Gennari, S.M.; Su, C.; Jones, J.L. 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitology, 139, 1375–1424. © Cambridge University Press
- Dubey, J. P.; Murata, F. H. A.; Cézar, C. K. C.; Kwok, O. C. H. Su, C. 2021. Epidemiological significance of *toxoplasma gondii* infections in wild rodents: 2009–2020. Journal of Parasitology. 107(2) 182–204. Review
- Du Plooy, I.; Mlangeni, M.; Christian, R.; Tsotetsi-Khambule, A.M. 2023. An African perspective on the genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: A systematic review. Parasitology 150, 551–578

- Domingos, A.; Ito, L. S.; Coelho, E.; Lúcio, J. M.; Matida, L. H.; Jr, A. N. 2013. Soroprevalência de IgG anti-Toxoplasma gondii em pessoas infectadas pelo HIV/Aids em Maputo, Moçambique. Rev Saúde Pública;47(5):890-6
- Elamin M. H. 2014. Genotyping of *Toxoplasma gondii* from Rats (*Rattus rattus*) in Riyadh, Saudi Arabia, Korean Journal Parasitol. Vol. 52, No. 3: 257-261
- Elmore, A.; Jones, J. L.; Conrad, P. A.; Patton, S.; Lindsay, D. S.; Dubey, J.P. 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention Stacey. Elsevier Ltd
- Ferreira, A. M.; Vitor, R. W. A.; Carneiro, A. C. A.V.; Brandão, G. P.; Melo, M. N. 2004. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). Infection, Genetics and Evolution 4, 131–142
- Ferreira, A. M.; Vitor, R.W.; Gazzinelli, R.T.; Melo, M.N. 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCRRFLP. Infect Genet Evol 6: 22–31
- Fuentes, I.; Rubio, J.M.; Ramirez, C.; Alvar, J. 2001, Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. J Clin Microbiol, 39:1566-1570
- Fundação Nacional de Saúde. 2002. Manual de Controle de Roedores. Brasília: Ministério da Saúde
- Frank, A.G. 2019. Latex agglutination test. Florida, University of Florida Health
- Frenkel, J. K., K. M. Hassanein., R. S. Hassanein., E. Brown., P. Thulliez e R. Q. Nunez. 1995. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53 (5): 458-468
- Galal, L.; Ajzenberg, D.; Hamidovic, A.; Durieux, M.F.; Dardé, M.L.; Mercier, A. 2018. Toxoplasma and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. Trends in Parasitology, Vol. 34, No. 2
- Galeh, T.M.; Sarvi, S.; Montazeri, M.; Moosazadesh, M.; Nakhaei, M.; Shariatzadeh S.A.; Daryani, A. 2020. Global Status of *Toxoplasma gondii* Seroprevalence in Rodents: A Systematic Review and Meta-Analysis. Frontiers in Veterinary Science, 7: 461

- Gangneux, F.R.; Dardé, M.L. 2012. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* p.264–296
- Garcia, J. L.; Navarro, I. T.; Ogawa, L.; Oliveira, R. C. 1999. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do paraná, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 9, n., p. 9-97
- Gennari, S. M.; Ogrzewalska, M. H.; Soares, H. S.; Saraiva, D. G.; Pinter, A.; Nieri-Bastos, F. A.; Labruna, M. B.; Szabó, M. P.; Dubey, J. P. 2015. *Toxoplasma gondii* antibodies in wild rodents and marsupials from the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 379-382
- Ghani, R. A. 2011. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. *Parasitol Res* 108:505–512
- Gomes, F.S. 2013. Desenvolvimento e Avaliação do teste de aglutinação com partículas de latex utilizando anticorpos policlonais para a detecção de antigenemia na paracoccidiodomicose. Tese de P s-graduação. Bel m-Par , Universidade Federal do Para
- Gray, J.J.; Balfour, A.H.; Wreghitt, T.G. 1990. Evaluation of a commercial latex agglutination test for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Serodiagnosis Immunother Infect Dis*, 4: 335–40
- Grigg, M. E.; Bonnefoy, S.; Hehl, A. B.; Suzuki, Y.; Boothroyd, J. C. 2001. Success and Virulence in *Toxoplasma* as the Result of Sexual Recombination between Two Distinct Ancestries. *Science, New Series*, Vol. 294, No. 5540, pp. 161-165
- Guo, Z. G.; Johnson, A. M. 1995. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strain by random ampli ed polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology* 111:127
- Guo, Z. G.; Johnson, A. M. 1996. DNA polymorphisms associated with murine virulence of *Toxoplasma gondii* identi ed by RAPD-PCR. *J. Biol. Chem.* 11:17
- Hall, L. S., M. A. Kasparian, D. Van Vuren, and D. A. Kelt. 2000. Spatial organization and habitat use of feral cats (*Felis catus* L.) in Mediterranean California. *Mammalia* 64: 19-28
- Halonen, S.K.; Weiss, L.M. 2013. ‘Toxoplasmosis’, *Handbook of Clinical Neurology* 114, 125–145, Vol. 114 (3rd series)

- Herbreteau, V.; Jittapalapong, S.; Rerkamnuaychoke, W.; Chaval, Y.; Cosson, J.F.; Morand, S. 2011. Protocols for Field and Laboratory Rodent Studies. Kasetsart University
- Hill, D. E.; Chirukandoth, S.; Dubey, J. P. 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Animal Health Research Reviews 6(1); 41–61
- Holliman, R.E. 1990. Investigation of HIV positive patients for toxoplasmosis using the latex agglutination test. Serodiagnosis and immunotherapy in infectious disease, 4:249-253
- Hosseini, S. A.; Sarvi, S.; Abediankenari, S.; Sharif, M.; Amouei, A.; Rezaei, F.; Daryani, A. 2021. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Wild Rats (*Rattus rattus*) in Northern Iran. Hindawi, Veterinary Medicine International Volume 2021, Article ID 6655696, 5 pages Research Article
- Howe, D. K.; Sibley, L. D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. Journal of Infectious Diseases, v. 172, p. 1561– 1566
- Howe, D.K.; Honore, S.; Derouin, F.; Sibley, L.D. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microbiol, 35:1411-1414
- https://pt.wikipedia.org/wiki/Parque_Nacional_do_Limpopo
- [https://Toxoplasmose/Biblioteca_Virtual_em_Saúde_MS_\(saude.gov.br\)](https://Toxoplasmose/Biblioteca_Virtual_em_Saúde_MS_(saude.gov.br))
- http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/Toxoplasmosis_il.asp?body=S-Z/Toxoplasmosis/body_Toxoplasmosis_il1.htm
- Innes, E. A. 2010. *Toxoplasma gondii*; history; disease; diagnosis; control. Zoonoses Public Health. 57, 1–7
- Ji, M.J.; Cho, H.C.; Park, Y.J.; Jang, D.H.; Park, J.; Choi, K.S. 2023. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in blood samples of domestic livestock in Republic of Korea. Pathogens, 12. 547
- Jones, J.L.; Dargelas, V.; Roberts, J.; Press, C.; Remington, J.S.; Montoya, J.G. 2009. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. Clin. Infect. Dis. 49, 878–884
- Jones, J.L.; Dubey, J.P. 2014. Epidemiologia da Toxoplasmose. In: SOUZA, W., and BELFORT JR., R., comp. Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. pp. 117- 126

- Júnior, P.A.D. 2017. Ocorrência de *Toxoplasma gondii* em Marsupiais e Roedores Silvestres Na Região Sul Da Bahia. Tese de Mestrado. Ilhéus – Bahia, Universidade Estadual da Santa Cruz
- Kasper, D. C.; Sadeghia K.; Prusaa, A.R.; Reischerc, G. H.; Kratochwilla, K.; Waldla E.F.; Gerstla N.; Haydea M.; Pollaka, A.; Herknera, K. R. 2009. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 63, 10–15
- Khan, A.; Taylor, S.; Su, C.; Mackey, A. J.; Boyle, J.; Cole, R.; Glover, D.; Tang, K.; Paulsen, I. T.; Berriman, M.; Boothroyd, J. C.; Pfefferkorn, E. R.; Dubey, J. P.; Ajioka, J.W.; Roos, D. S.; Wootton, J. C.; Sibley L. D. 2005. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. Nucleic Acids Research, Vol. 33, No. 9
- Kim, K.; Weiss, L. M.; 2008. Toxoplasma: the next 100 years; Microbes Infect. July; 10(9): 978–984
- Kolören, Z.; Dubey, J. P. 2020. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Turkey. Parasitology. 147,12–28
- Kompalic-Cristo, A.; Frotta, C.; Mutis, S. M.; Fernandes, O.; Britto, C. 2007. Evolution of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. Parasitol Res; v. 101, p. 619-625
- Kotula, A. W.; Dubey, J. P.; Sharar, A. K.; Andrews, C. D.; Shen, S. K.; Lindsay, D. S. 1991. Effect of Freezing on Infectivity of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork Journal of Food Protection, Vol. 54, No. 9 Pages 657-690
- Manuel, L.; Gomes G. S.; Noormahomed, E. V. 2020. Human toxoplasmosis in Mozambique: gaps in knowledge and research opportunities. Parasites Vectors 13:571
- Mapaco, L.; Crespin, L.; Rodrigues, D.; Bellocq, J. G.; Bryja, J.; Bourgarel, M.; Missé, D.; Caron, A.; Fafetine, J.; Cappelle, Julien.; Liégeois, F. 2022. Detection and genetic diversity of Mopeia virus in *Mastomys natalensis* from different habitats in the Limpopo National Park, Mozambique. Infection, Genetics and Evolution 98. 105204
- Marshall, P.A., Hughes, J.M.; Williams, R.H.; Smith, J.E.; Murphy, R.G.; Hide G. 2004. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma*

- gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. *Parasitology*, 128 (1): 39–42
- Mazumder, P.; Chuang, H.Y.; Wentz, M.W., Wiedbrauk, D.I. 1988. Agglutination Test for Detection of Antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 1988, p. 2444-2446 Vol. 26, No. 11 0095-1137/88/112444-03\$02.00/0 Copyright C, American Society for Microbiology Latex
 - Meneses, R.M. (2016). Tripanossomose bovina em Minas Gerais. Tese de mestrado. Belo Horizonte, Escola de Veterinária – UFMG
 - Meerburg, B. G. e Kijlstra, A. 2009. Changing climate—changing pathogens: *Toxoplasma gondii* in North-Western Europe *Parasitol Res*; 105:17–24 REVIEW
 - Mercier, A.; Devillard, S.; Ngoubangoye, B.; Bonnabau, H.; Banuls, A. L.; Durand, P.; Salle, B.; Ajzenberg, D.; Darde, M.L. 2010. Additional Haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population Structure and Mouse-Virulence of Strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis* 4(11): e876
 - Mercier, A.; Garba, M.; Bonnabau, H.; Kane, M.; Rossi, J.; Dardé, M.; Dobigny, G. 2013. Toxoplasmosis seroprevalence in urban rodents: a survey in Niamey, Niger. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 108 (4): 399-407
 - Mohammed, O.B.; Omar, O.I.; Elamin, E.A.; Bushara, H.O.; Omer, A.S.; Alagaili, N.A. 2019. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in household and stray cats of Riyadh, Saudi Arabia. *Vet Ital* 2019; 55(3): 241-245
 - Moncada, P. A.; Montoya, J. G. 2012. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. Jul;10(7):815-28
 - Mondragon, R.; Howe, D. K.; Dubey, J. P.; David, L. 1998. American Society of Parasitologists 1998 Genotypic Analysis of *Toxoplasma gondii* Isolates from Pigs *J. Parasitol.*, 84(3), p. 639-641
 - Montoya, J. G. 2002. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*;185(Suppl 1): S73–82
 - Montoya, J.G.; Liesenfeld, O. 2004. Toxoplasmosis. *Seminars*. v.363, p.1965-1976, 1969-1970
 - Moura, M. A.; Amendoeira, M. R.; Barbosa, H. S. 2009. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(6): 862-864

- Motazedian, M.; Parhizkari, M.; Mehrabani, D.; Hatam, G.; Asgari, Q. 2010. First Detection of *Leishmania major* in *Rattus norvegicus* from Fars Province, Southern Iran. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10 (10): 968-975
- Muradian, V.; Ferreira, L. R.; Lopes, E. G.; Esmerini, P. O.; Pena, H. F.; Soares, R. M.; Gennari, S. M. 2012. A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. *J. Parasitai.*, 98(1), 2012, pp. 128-134 © American Society of Parasitologists
- Neiva, H. 2005. Frequência de Anticorpos de *Leishmania sp.* em *Rattus norvegicus* no Município de Belo horizonte, Minas Gerais. Tese de Mestrado. Brasil, Universidade Geral de Minas Gerais
- Ntungwa, H. O.; Mwega, E.; Mkupasi, E. M.; Katakweba, A. S. 2024. Seroprevalence and molecular detection of *Toxoplasma gondii* infecting Rodents and Pigs in Iringa Municipality, Tanzania. *Journal of Ideas in Health*. 7(5):1148-1158
- Ode, S.; Jarikre, T.; Jubril, A. J.; Ularamu, H.; Luka, P.; Adamu, M.; Emikpe, B. 2022. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in Nigerian wild rats by molecular detection. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 35. 100776
- Okay, T.S.; Yamamoto, L.; Oliveira, L.C.; Manuli, E.R.; Andrade, J. H.F.; Del Negro, G.M. 2009. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital Toxoplasmosis in Sao Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics (Sao Paulo)* 64. 3: 171-6
- Reiter-Owona, I.; Petersen, E.; Joynson, D.; Aspöck, H.; Darde, M.; Disko, R.; Dreazen, O.; Dumon, H.; Grillo, R.; Gross, U. M. Hayde, R. Holliman, D. O. Ho-Yen, K. Janitschke, P. A. Jenum, K. Naser, M.; Olszewski, H.; Thulliez, P.; Seitz, M. 1999. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull. W. H. O.* 77:929–935
- Paul, E.; Kiwelu, I.; Mmbaga, B.; Nazareth, R.; Sabuni, E.; Maro, A.; Ndaró, A.; Halliday, J. E. B.; Cholongola, J. 2018. *Toxoplasma gondii* seroprevalence among pregnant women attending antenatal clinic in Northern Tanzania. Paul et al. *Tropical Medicine and Health* 46:39
- Pelloux, H.; Guy, E.; Angelici, M. C.; Aspöck, H.; Bessièrès, M. H.; Blatz, R.; Del Pezzo, M.; Girault, V.; Gratzl, R.; Holberg-Petersen M.; Johnson, J.; Krüger, D.; Lappalainen, M.; Naessens, A.; Olsson, M. 1998: A second European

- collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. FEMS Microbiol. Lett. 165, 231–237
- Rabiee H. M.; Mahmoudi A.; Siah sarvie R.; Krystufek B.; Mostafavi E.; 2018. Rodent-borne diseases and their public health importance in Iran Mohammad Hasan. PLoS Negl Trop Dis 12(4): e0006256s
 - Remington, J.S.; McLeod, R.; Thullie, P.; Desmonts, G. 2005. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Baker C, Wilson E, Klein JO (eds) Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 6th edn. WB Saunders, Philadelphia, pp 947–1091
 - Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P., Desmonts, G., 2006. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S., Klein, J.O., Wilson, C.B., Baker, C.J. (Eds.), Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 947–1091
 - Rey, L. 2001. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan
 - Robert, G. F., Darde, M.L. 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol 25:264–296
 - Rodríguez, E. I.; Fernández-Álvarez, A.; Martín-Carrilo, N.; Feliu, C.; Marchand, B.; Quilichini, Y.; Foronda, P. 2019. Rodents as Reservoirs of the Zoonotic Pathogens *Coxiella burnetii* and *Toxoplasma gondii* in Corsica (France). VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES Volume XX, Number XX, 2019 ^a Mary Ann Liebert, Inc
 - Ruffolo, B.B.; Toledo, R.S.; Martins, F.D.; Bugni, F.M.; Costa, L.; Marana, E.R. 2016. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative urban rats and presence of antibodies in communicating dogs in Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 8 (28)
 - Sabin, A. B.; Feldman, H. A. 1948. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*) Source: Science, New Series, Vol. 108, No. 2815, pp. 660-663
 - Salibay, C.; Claveria F. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in Philippines *Rattus* spp. Confirmed through bioassay in *Mus musculus*. Vet. Arhiv. 76: 351-361
 - Sensini, A. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. Clinical Microbiology and Infection, 12: 504-512

- Sevilas, T. V.; 2010. Prevalência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em grávidas da região de Lisboa e Vale do Tejo e estudo dos factores de risco. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em ciências biomédicas
- Shulman, I.A., Appleman, M.D. 1991. Transmission of parasitic and bacterial infections through blood transfusion within the US. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 28, 447–459
- Smith, D.D.; Frenkel, J.K.; 1995. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. J. Wildl. Dis. 31:15–21
- Sibley, L. D., Boothroyd, J.C. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature, 359:82-85
- Sibley, L. D.; Khan, A.; Ajioka, J. W.; Rosenthal, B. M. 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Phil. Trans. The Royal Society 364, 2749–2761
- Simon, S.; Thoisy, B.; Mercier, A.; Nacher, M.; Demar, M. 2019. Virulence of atypical *Toxoplasma gondii* strains isolated in French Guiana in a murine model. Parasite 26: 60 doi:10.1051/parasite/2019048
- Singh, B. 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Int J Parasitol 27: 1135-1145
- Siteo, S.P.B.L.; Rafael, B.; Meireles, L.R.; Andrade Jr., H.F.; Thompson, R. 2010. Preliminary report of HIV and *Toxoplasma gondii* occurrence in pregnant women from Mozambique. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 52(6): 291-5
- Skinner, J.D.; Chimimba, C.T. 2005. The mammals of the southern Africa and subregion. 3rd ed. Cambridge University Press
- Souza, W.; Damatta, R. A.; Attias, M. 2009. Brazilian contribution for a better knowledge on the biology of *Toxoplasma gondii*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104: 149-154
- Souza, W.; and Belfort JR. 2014. Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 214 p. ISBN: 978-85-7541-571-9
- Stelzer, S.; Basso, W.; Silván, J. B.; Ortega-Mora, L.M.; Maksimov, P.; Gethmann, J.; Conraths, F.J.; Schares, G. 2019. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. Food and Waterborne Parasitology 12, e00037

- Su, C.; Zhang, X.; Dubey J.P. 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology* 36,841–848
- Su, C.; Shwab, E. K.; Zhou, P.; Zhu, X.Q.; Dubey, J.P. 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* ,137, 1–11. Cambridge University Press
- Sukthana, Y.; Chintana, T.; Supatanapong, W.; Siripan, C.; Lekkla, A.; Cheabchalrad R. 2001. Predictive value of latex agglutination test in serological screening for *Toxoplasma gondii*. *Southeast asian j trop med public health* Vol 32 No. 2
- Tagwireyi, W. M.; Etter, E.; Neves, L. 2019. Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic animals in southeastern South Africa. *Journal of Veterinary Research* 86(1), a1688
- Tenter, A. M.; Heckerotha, A. R.; Weiss, L. M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Published in final edited form as: *Int J Parasitol.*; 30(12-13): 1217–1258
- Tenter, Astrid M.; 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 104(2): 364-369
- Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; Dunn, A.M.; Jennings, F.W. 1998. *Parasitologia Veterinária*. Guanabara Koogan.S.A. 2ª Edição
- Valverde, L.R. 2015. Contribuciónn al Conocimiento de la Epidemiología de la Toxoplasmosis. Papel de los Roedores en Diferentes Ámbitos. Tese de Licenciatura. Uruguay, Universidad de la República Uruguay
- Velmurugan, G.V.; Dubey, J.P.; Su, C. 2008. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol* 155: 314–318
- Villena, I.; Ancelle, T.; Delmas, C.; Garcia, P.; Brézin, A. P.; Thulliez, P.; Wallon, M.; King, L.; Goulet, V. 2005. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system Toxosurv network and National Reference Centre for Toxoplasmosis.
- Vollaire, M.R. Radacki, S.V.; Lappin, M.R. 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in clinically ill cats in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 66, 874–877

- Weiss, L.M.; Laplace, D.; Takvorian, P.M.; Tanowitz, H.B.; A. Cali, Wittner, M. 1995. A Cell Culture System for Study of the Development of *Toxoplasma gondii* Bradyzoites. J. Eukaryot. Microbiol., 42 (1995), pp. 150-157
- Weiss, L.M.; Dubey, J.P. 2009. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. Int J Parasitol. July 1; 39(8): 895–901
- Wolf, A.; Cowen, D.; Paige, B. 1939. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. Science 10;89(2306):226-7
- Yan, C.; Liang, L.J.; Zhang, B.B.; Lou, Z.L.; Zhang, H.F.; Shen, X. 2014. Prevalence and genotyping of *Toxoplasma gondii* in naturally-infected synanthropic rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*) in eastern China. Parasit Vectors; 7(1): 591

9 ANEXOS

9.1. Tabela de distribuição das espécies por localidade, sexo, presença de anticorpos e genotipagem

ID	Localização	ID campo	Genero	Espécie	Sexo	Sorologia	PCR
1	Mavoze village 1	4	Rattus	rattus	female	0	
2	Mavoze village 1	5	Rattus	rattus	female	1	0
3	Mavoze village 1	6	Rattus	rattus	female	0	
4	Mavoze village 1	7	Rattus	rattus	female	1	0
5	Mavoze village 1	8	Rattus	rattus	female	1	0
6	Mavoze village 1	7	Rattus	rattus	female	1	0
7	Mavoze village 1	9	Rattus	rattus	female	0	
8	Mavoze village 1	10	Rattus	rattus	female	1	0
9	Mavoze village 1	11	Rattus	rattus	male	0	
10	Mavoze village 1	12	Rattus	rattus	male	0	
11	Mavoze village 1	13	Saccostomus	campestris	female	0	
12	Mavoze village 1	14	Rattus	rattus	female	0	
13	Mavoze village 1	15	Rattus	rattus	female	0	
14	Mavoze village 1	16	Rattus	rattus	female	0	
15	Chibotane village1	35	Mastomys	natalensis	female	0	
16	Chibotane village1	36	Rattus	rattus	male	0	
17	Chibotane village1	38	Rattus	rattus	female	1	0
18	Chibotane village1	39	Rattus	rattus	female	1	0
19	Chibotane village1	40	Rattus	rattus	female	1	0
20	Chibotane village1	42	Rattus	rattus	female	1	0
21	Chibotane village1	44	Rattus	rattus	female	1	0
22	Chibotane village1	46	Mastomys	natalensis	female	1	0
23	Chibotane village1	49	Rattus	rattus	female	0	
24	Chibotane village1	66	Thallomys	paedulcus	male	0	
25	Chibotane village1	68	Mastomys	natalensis	male	1	
26	Chibotane village1	69	Rattus	rattus	female	1	0
27	Chibotane village1	70	Mastomys	natalensis	female	1	1
28	Chibotane village1	71	Thallomys	paedulcus	male	0	
29	Chibotane village1	72	Rattus	rattus	female	0	
30	Chibotane village1	74	Rattus	rattus	male	0	
31	Chibotane village1	75	Rattus	rattus	male	0	
32	Chibotane village1	76	Rattus	rattus	female	0	
33	Chibotane village1	77	Mastomys	natalensis	female	0	
34	Chibotane village1	78	Mastomys	natalensis	female	0	
35	Chibotane village1	100	Mastomys	natalensis	male	0	
36	Chibotane village1	101	Mastomys	natalensis	female	0	
37	Chibotane village1	105	Mastomys	natalensis	male	0	
38	Machavule village 1	121	Rattus	rattus	male	0	

39	Machavule village 1	122	Rattus	rattus	female	0	
40	Machavule village 1	123	Rattus	rattus	female	0	
41	Machavule village 1	124	Rattus	rattus	male	0	
42	Machavule village 1	125	Rattus	rattus	male	0	
43	Machavule village 1	126	Rattus	rattus	female	0	
44	Machavule village 1	127	Rattus	rattus	female	0	
45	Machavule village 1	128	Rattus	rattus	female	0	
46	Machavule village 1	129	Rattus	rattus	female	1	0
47	Machavule village 1	130	Rattus	rattus	female	0	
48	Machavule village 1	131	Rattus	rattus	female	0	
49	Machavule village 1	132	Rattus	rattus	male	0	
50	Machavule village 1	133	Rattus	rattus	male	0	
51	Machavule village 1	134	Rattus	rattus	female	0	
52	Machavule village 1	135	Rattus	rattus	male	0	
53	Machavule village 1	136	Rattus	rattus	female	0	
54	Machavule village 1	137	Thallomys	paedulcus	male	0	
55	Machavule village 1	138	Rattus	rattus	female	0	
56	Machavule village 1	139	Rattus	rattus	female	0	
57	Machavule village 1	140	Rattus	rattus	female	1	0
58	Machavule village 1	141	Rattus	rattus	male	0	
59	Machavule village 1	142	Rattus	rattus	male	0	
60	Machavule village 1	143	Thallomys	paedulcus	female	1	0
61	Machavule village 1	144	Rattus	norvegicus	female	1	0
62	Machavule village 1	145	Rattus	rattus	male	0	
63	Machavule village 1	146	Rattus	norvegicus	female	0	
64	Macavene wildlife 1	147	Saccostomus	campestris	male	0	
65	Macavene wildlife 1	148	Saccostomus	campestris	male	0	
66	Macavene wildlife 1	149	Saccostomus	campestris	female	1	0
67	Macavene wildlife 1	150	Gerbilliscus	leucogaster	male	1	0
68	Machavule village 1	151	Rattus	rattus	male	1	0
69	Chibotane field 2	305	Saccostomus	campestris	female	1	0
70	Chibotane field 2	306	Mastomys	natalensis	male	1	0
71	Chibotane field 2	307	Mastomys	natalensis	female	1	0
72	Chibotane field 2	308	Mastomys	natalensis	female	0	
73	Mavoze field 4	309	Mastomys	natalensis	female	1	0
74	Mavoze field 4	310	Saccostomus	campestris	male	0	
75	Mavoze field 4	311	Mastomys	natalensis	female	0	
76	Mavoze field 4	315	Mastomys	natalensis	female	1	0
77	Chibotane field 2	316	Saccostomus	campestris	male	1	0
78	Chibotane field 2	317	Mastomys	natalensis	male	0	
79	Chibotane field 2	318	Mastomys	natalensis	male	1	0
80	Chibotane field 2	319	Mastomys	natalensis	male	1	0
81	Chibotane field 2	320	Mastomys	natalensis	female	1	0

82	Chibotane field 2	321	Mastomys	natalensis	female	1	0
83	Chibotane field 2	322	Mastomys	natalensis	male	0	
84	Chibotane field 2	323	Mastomys	natalensis	female	1	
85	Chibotane field 2	324	Mastomys	natalensis	male	1	
86	Chibotane field 2	325	Mastomys	natalensis	female	0	
87	Chibotane field 2	326	Mastomys	natalensis	male	1	
88	Chibotane field 2	327	Mastomys	natalensis	male	1	
89	Chibotane field 2	328	Mastomys	natalensis	female	0	
90	Chibotane field 2	329	Mastomys	natalensis	female	1	
91	Chibotane field 2	330	Mastomys	natalensis	female	1	
92	Chibotane field 2	331	Mastomys	natalensis	male	1	
93	Chibotane field 2	332	Mastomys	natalensis	male	0	
94	Chibotane field 2	333	Mastomys	natalensis	male	1	
95	Chibotane field 2	334	Mastomys	natalensis	male	1	
96	Chibotane field 2	335	Mastomys	natalensis	male	0	
97	Chibotane field 2	336	Mastomys	natalensis	female	1	
98	Chibotane field 2	337	Mastomys	natalensis	male	0	
99	Chibotane field 2	338	Mastomys	natalensis	female	0	
100	Chibotane field 2	339	Saccostomus	campestris	female	1	
101	Chibotane field 2	340	Mastomys	natalensis	female	1	
102	Chibotane field 2	341	Saccostomus	campestris	female	1	
103	Chibotane field 2	342	Mastomys	natalensis	male	0	
104	Chibotane field 2	343	Mastomys	natalensis	female	0	
105	Chibotane field 2	344	Mastomys	natalensis	female	0	
106	Chibotane field 2	345	Mastomys	natalensis	female	0	
107	Chibotane field 2	346	Mastomys	natalensis	female	1	
108	Chibotane field 2	347	Mastomys	natalensis	female	0	
109	Chibotane field 2	348	Mastomys	natalensis	male	1	
110	Chibotane field 2	349	Mastomys	natalensis	male	0	
111	Chibotane field 2	350	Mastomys	natalensis	female	1	
112	Chibotane field 2	351	Mastomys	natalensis	male	1	
113	Chibotane field 2	352	Mastomys	natalensis	male	1	
114	Chibotane field 2	353	Mastomys	natalensis	female	1	
115	Chibotane field 2	354	Mastomys	natalensis	female	0	
116	Chibotane field 2	355	Mastomys	natalensis	female	0	
117	Chibotane field 2	356	Mastomys	natalensis	female	1	
118	Chibotane field 2	358	Saccostomus	campestris	female	1	
119	Chibotane field 2	359	Mastomys	natalensis	male	1	
120	Chibotane field 2	360	Mastomys	natalensis	male	1	
121	Chibotane field 2	362	Mastomys	natalensis	female	1	
122	Chibotane field 2	364	Mastomys	natalensis	female	1	
123	Chibotane field 2	365	Mastomys	natalensis	female	0	
124	Chibotane field 2	366	Mastomys	natalensis	female	0	

125	Chibotane field 2	367	Mastomys	natalensis	female	0	
126	Chibotane field 2	368	Mastomys	natalensis	female	0	
127	Chibotane field 2	369	Mastomys	natalensis	female	0	
128	Chibotane field 2	370	Mastomys	natalensis	male	1	
129	Chibotane field 2	371	Mastomys	natalensis	female	1	
130	Chibotane field 2	372	Mastomys	natalensis	male	1	
131	Chibotane field 2	374	Mastomys	natalensis	female	1	
132	Chibotane field 2	376	Mastomys	natalensis	female	0	
133	Chibotane field 2	377	Mastomys	natalensis	male	0	
134	Chibotane field 2	379	Mastomys	natalensis	male	0	
135	Chibotane field 2	383	Mastomys	natalensis	female	0	
136	Mavoze field 4	395	Mastomys	natalensis	female	1	
137	Mavoze field 4	396	Mastomys	natalensis	male	0	
138	Mavoze field 4	397	Mastomys	natalensis	female	0	
139	Mavoze field 4	399	Mastomys	natalensis	female	0	
140	Mavoze field 4	401	Mastomys	natalensis	female	1	
141	Mavoze field 4	402	Mastomys	natalensis	female	0	
142	Mavoze field 4	403	Mastomys	natalensis	female	0	
143	Mavoze field 4	404	Mastomys	natalensis	female	0	
144	Mavoze field 4	405	Mastomys	natalensis	male	1	
145	Mavoze field 4	406	Mastomys	natalensis	female	0	
146	Mavoze field 4	407	Mastomys	natalensis	male	0	
147	Mavoze field 4	408	Mastomys	natalensis	female	0	
148	Mavoze field 4	409	Mastomys	natalensis	female	1	
149	Mavoze field 4	440	Mastomys	natalensis	female	1	
150	Mavoze field 4	441	Mastomys	natalensis	male	0	
151	Mavoze field 4	442	Mastomys	natalensis	female	0	
152	Mavoze field 4	443	Mastomys	natalensis	male	1	
153	Mavoze field 4	444	Mastomys	natalensis	male	0	
154	Mavoze field 4	446	Mastomys	natalensis	male	0	
155	Mavoze field 4	447	Mastomys	natalensis	female	1	
156	Mavoze field 4	448	Mastomys	natalensis	male	1	
157	Mavoze field 4	449	Mastomys	natalensis	female	1	
158	Mavoze field 4	450	Mastomys	natalensis	male	0	
159	Mavoze field 4	451	Mastomys	natalensis	female	0	
160	Mavoze field 4	452	Mastomys	natalensis	female	1	
161	Mavoze field 4	453	Mastomys	natalensis	female	1	

9.2. Perfil da amostragem de campo no presente estudo

Número de indivíduos amostrados por área de amostragem (Bosque/machamba/vila) e por aldeia

Area	Chibotane	Macavene	Machavule	Mavoze	Grand Total
Bosque	0	4	0	0	4
Machamba	63	0	0	30	93
Vila	23	0	27	14	64
Grand Total	0	86	4	27	44

Número de amostras por espécie de roedores, sexo e aldeia

Espécie	Chibotane			Macavene			Machavule			Mavoze			Grande Total
	Female	Male	Total	Female	Male	Total	Female	Male	Total	Female	Male	Total	
<i>G. leucogaster</i>					1	1							1
<i>M. natalensis</i>	39	28	67							20	9	29	96
<i>R. norvegicus</i>							2		2				2
<i>R. rattus</i>	9	3	12				13	10	23	11	2	13	48
<i>S. campestris</i>	4	1	5	1	2	3				1	1	2	10
<i>T. paedulus</i>		2	2				1	1	2				4
Grand Total	52	34	86	1	3	4	16	11	27	32	12	44	161